

UNTERSUCHUNGEN ZUR GESTEIGERTEN NK-ZELL-
VERMITTELTEN LYSE VON LEUKÄMIEZELLEN NACH
IN-VITRO BEHANDLUNG MIT ACTINOMYCIN D

JOHANNES ERHARDT

1986

*Diss
München*

I

Aus dem Institut für Immunologie der Universität München
Vorstand: Professor Dr. Gerd Riethmüller

Untersuchungen zur gesteigerten NK-Zell-vermittelten Lyse
von Leukämiezellen nach in-vitro Behandlung mit
Actinomycin D

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Johannes Erhardt

aus
Kulmbach

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

Berichterstatter Prof. Dr. G. Riethmüller

Dekan Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung 25. März 1986

III

Für die angenehme Zusammenarbeit im Labor danke ich Ulrike Goldschmidt, Barbara Seidel, Agnes Fütterer, Irene Krebs und Christine Wagenpfeil und allen anderen Mitarbeitern im Institut für Immunologie.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Gerd Riethmüller für die Möglichkeit in seinem Institut zu promovieren, viele wertvolle Diskussionen, sein wohlwollendes Interesse und seine Geduld.

Ebenso verbunden fühle ich mich Herrn Dr. H.W. Löms Ziegler-Heitbrock für den Arbeitsplatz in seinem Labor, die freundschaftliche Betreuung und die intensiven Diskussionen während der Arbeit an dieser Dissertation.

Meiner Schwester Eva Pöhlmann und meinem Schwager Jochen Pöhlmann danke ich für die unschätzbare Hilfe bei der Fertigstellung des Manuskripts, Frau Anneliese Reichert für das Tippen des Originals und Fräulein Hildegard Hain für die moralische Unterstützung, die sie mir zukommen ließ.

Gliederung

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Historischer Überblick: Die Entdeckung des NK-Phänomens	1
1.2. Charakteristik der spontan zytotoxischen Effektorzellen: NK-Zellen	3
1.3. Der Mechanismus der Lyse durch NK-Zellen	5
1.4. Spezifität der Lyse durch NK-Zellen	10
2. Material und Methoden	14
2.1. Materialien	14
2.2. Methoden	17
2.2.1. Blutentnahme	17
2.2.1.1. Patientenblut	17
2.2.1.2. Blut gesunder Spender	17
2.2.2. Separation des Blutes	17
2.2.3. Cryopräservierung von normalen Blutzellen und Leukämiezellen	21
2.2.3.1. Einfrieren der Zellen	21
2.2.3.2. Auftauen der Zellen	23
2.2.4. Behandlung der Targetzellen mit Actinomycin D	24
2.2.5. Aktivierung der Effektorzellen mit Interferon	24
2.2.6. Der ^{51}Cr -Freisetzungstest = CRA (Chromium release assay)	25
2.2.6.1. Prinzip des CRA	25
2.2.6.2. Markierung der Targetzellen mit ^{51}Cr -Chromat	26
2.2.6.3. Ansetzen der Testplatten	26
2.2.6.4. Auswertung des CRA	28
2.2.7. "Cold-Target-Inhibition-Assay"	29
2.2.8. Stimulation von PBM mit Phytohemagglutinin P	30

	Seite
3. Ergebnisse	31
3.1. Lyse von frischen und eingefrorenen AL-Blasten durch mononukleäre Zellen des peripheren Blutes	31
3.2. Steigerung der Lyse der Leukämie-Blasten	34
3.2.1. Gesteigerte Lyse durch Interferon	34
3.2.2. Steigerung der Lyse von AL-Blasten durch Vorbehandlung der Blasten mit Actinomycin D	38
3.2.2.1. Lyse durch PBM	39
3.2.2.2. Lyse durch IFN-aktivierte PBM	44
3.2.2.3. Einfluß verschiedener Parameter der Vorinkubation und der Testdauer auf die Lyse der AL-Blasten durch IFN-aktivierte PBM	44
3.2.2.3.1. Einfluß der Act D-Konzentration	44
3.2.2.3.2. Auswirkung der Dauer der Vorinkubation mit Act D	47
3.2.2.3.3. Kinetik der Lyse der Vg*-Blasten durch +IFN-PBM	49
3.2.2.4. Testung des Actinomycin D-Effektes auf die Lysierbarkeit mehrerer Leukämie-Proben	51
3.2.2.5. Einfluß der Lagerung der Zellen in N ₂	57
3.3. Kontrollexperimente	59
3.3.1. PBM als Target-Zellen	59
3.3.2. PHA-Blasten als Target-Zellen	61
3.3.3. NK-sensible Zelllinien als Targets	61
3.4. Untersuchungen zum Mechanismus der Sensibilisierung durch Act D	62

	Seite
3.4.1. Autologe Cold-Target-Inhibition	62
3.4.2. Spezifität der Lyse der AL-Blasten durch PBM	65
4. Diskussion	68
4.1. Einfluß des biologischen Einfrierverfahrens auf Target- und Effektorzellen	68
4.2. Berechnung von SR und Einfluß der spontanen Chrom-Freisetzung S auf die Ergebnisse	70
4.3. Einfluß von Interferon auf die NK-Lyse von Leukämie-Zellen	73
4.4. Einfluß von Actinomycin D auf die Lyse von AL-Blasten durch aktivierte und nicht akti- vierte PBM	73
4.4.1. Kooperativer Effekt von Act D und IFN	73
4.4.2. Dosisabhängigkeit der Actinomycin D- Wirkung	74
4.4.3. Unwirksamkeit von Act D bei vier von acht Leukämien	75
4.4.4. Wirkmechanismus von Actinomycin D	76
4.5. Effektorzellen und Spezifität des Act D- Effektes	83
4.6. Mögliche therapeutische Relevanz	86
4.6.1. <u>In-vivo</u> Bedeutung des NK-Phänomens	86
4.6.2. Hinweise auf therapeutische Relevanz	92
5. Zusammenfassung	96
6. Liste der verwendeten Abkürzungen	97
7. Literaturverzeichnis	100
Lebenslauf	126

1. Einleitung

1.1. Historischer Überblick: Die Entdeckung des NK-Phänomens

Nachdem in verschiedenen Tier - Tumorsystemen eine - mit Lymphozyten übertragbare - Immunität gegen Tumorantigene gefunden worden war, versuchten in den frühen 70er Jahren viele Immunologen eine tumorspezifische Immunreaktion auch bei Krebspatienten nachzuweisen und dadurch tumorspezifische bzw. tumorassoziierte Antigene beim Menschen zu definieren, um sie z.B. für eine Immundiagnose des Krebses - vergleichbar der Serodiagnose in der Mikrobiologie - nutzbar zu machen (66). Verschiedene Gruppen berichteten über eine spezifische lymphozytenvermittelte Zytotoxizität von Tumorpatienten gegen eigenes Tumormaterial oder allogenenes Tumorgewebe derselben Histologie (58, 62, 102, 180) oder von Lymphozyten von Verwandten gegen die Leukozyten von Leukämie-Patienten (156). Die Reaktivität der Patienten-Lymphozyten wurde meist nach dem Prinzip des "Colony Inhibition Assay" nach Hellström (57) oder dessen Abwandlung, dem Mikroassay nach Takasugi und Klein (176) gemessen. Dabei wurden Tumorzellen kurz in Kultur genommen, auf Plastikplatten oder halbfesten Medien plattiert und die Reduktion der Tumorzellzahl nach 2- bis 5-tägiger Inkubation mit Patienten-Lymphozyten optisch oder durch Isotopenfreisetzung bestimmt. Als Referenz dienten gleiche Ansätze mit Lymphozyten normaler Spender oder von Patienten mit anderen Tumoren an Stelle der Patienten-Lymphozyten. Das Ergebnis wurde in Reduktion der Tumorzellzahl durch die Patienten-Lymphozyten verglichen mit der Reduktion durch die Lymphozyten des Referenzspenders ausgedrückt. Es zeigte sich jedoch bald, daß auch die Lymphozyten normaler Spender in diesen Tests und selbst in einem 4-Stunden Chrom-Freisetzungstest nach Brunner (18 und Methoden 2.2.6) gegenüber der Mediumkontrolle (Tumorzellen ohne Lymphozyten) eine repr-

duzierbare zytolytische Aktivität gegen dieselben Tumoren und gegen etablierte Tumorzelllinien und lymphoblastoide Zelllinien (111) aufwiesen, die oft sogar höher lag als die der Patienten und bis zu 100% Reduktion der Tumorzellzahl erreichte (89, 102, 111, 112, 129, 157, 167, 168, 177, 178, 180). Insbesondere durch die kurze Testzeit im 4-Stunden Chrom-Freisetzungstest war eine in-vitro -Sensitivierung gegen Alloantigene als verantwortlicher Wirkmechanismus ausgeschlossen. Die Tumorphistologie-spezifische Reaktivität erwies sich als Produkt des Testaufbaus, der Auswertungsverfahren und der Auswahl der Kontrollen. In groß angelegten Studien mit tausenden Tumor-Lymphozyten-Kombinationen und umfangreichen Kontrollen fand sich, daß die zytolytische Aktivität von Lymphozyten der Tumorpatienten gegen ein breites Spektrum von Tumoren verschiedener Histologien gerichtet ist und der eigene Tumortyp keineswegs immer am stärksten lysiert wird (128, 179). Eine ebenso breite und meist eher stärkere Reaktivität fand sich bei den Lymphozyten normaler Spender (128, 177, 179). Herberman konstatierte: "... We must therefore consider seriously, that normal human reactivity is a real phenomenon and not particularly rare ..." (66). Ein entsprechendes Phänomen wurde auch bei Mäusen (92, 93, 123, 164) und Ratten (129) beschrieben.

Die breite spontane zytolytische Aktivität normaler Lymphozyten gegen Tumoren und die Reaktivität der Lymphozyten von Tumorpatienten gegen ein ebenso breites Spektrum verschiedener Tumortypen machten es unmöglich, die Reaktivität von Patienten-Lymphozyten gegen den eigenen Tumortyp als "spezifisch gegen diesen Tumortyp" zu interpretieren. Andererseits bot sich diese spontane zytolytische Aktivität gegen Tumorzellen, die keiner bekannten Immunität bedarf, als erste Linie in der Unterdrückung der Entstehung malignen

Wachstums an (66, 157) - als Ergänzung oder Ersatz der Immunsurveillance-Theorie nach Burnet und Thomas (20, 21, 183) - , sodaß sie Gegenstand intensiver Forschung wurde.

1.2. Charakteristik der spontan zytotoxischen Effektorzellen: NK-Zellen

Nachdem eine spontane zytotoxische Aktivität normaler Spender als reales Phänomen anerkannt worden war, wurden auch bald Namen dafür gefunden. Am besten durchgesetzt haben sich die Bezeichnungen "Natürliche Killerzell"-Aktivität, kurz NK (92, 93) bzw. NK-Zelle für die zytolytisch aktive Zelle.

Die Definition des NK-Phänomens bzw. der NK-Zellen ist auch heute streng genommen noch operational. NK-Zellen sind demnach lymphoide Zellen, die ohne bekannte vorherige Immunisierung bestimmte Zellen in relativ kurzer Zeit lysieren (98, 141). Davon abzugrenzen sind Monozyten/Makrophagen, die ebenfalls eine nicht-immune Zytotoxizität gegen Tumoren aufweisen können (1, 60). Zum Studium der NK-Zellen bzw. als Referenz-Tumor für NK-Aktivität wird zunehmend die Zelllinie K 562 verwendet, die sehr NK-sensibel ist und von den Lymphozyten praktisch aller Spender lysiert wird. Daher wird NK-Aktivität oft operational mit spontaner zytolytischer Aktivität gegen K 562 gleichgesetzt und als NK-Zellen werden die Zellen bezeichnet, die K 562-Zellen in einem Kurzzeit-Chrom-Freisetzungstest (meist 4 h) lysieren (z.B. 131, 138, 194). Durch Zellfraktionierung mit verschiedenen Methoden insbesondere Depletionsverfahren wurde schon früh gefunden, daß die NK-Aktivität von einer Lymphozytensubpopulation getragen wird, die sich von klassischen T- und B-Zellen und Makrophagen abgrenzen läßt (62, 80, 95, 156, 194).

Im Gegensatz zu Monozyten/Makrophagen sind NK-Zellen nicht phagozytisch und adhärieren nicht an Plastikoberflächen oder Nylonwolle. Sie tragen keine Oberflächenimmunglobuline wie B-Zellen es tun, die ebenfalls an Nylonwolle adhärieren. NK-Zellen formen unter Standardbedingungen keine Rosetten mit Schaferythrozyten, während diese Rosettenbildung der charakteristische Marker für humane T-Zellen ist. Alle NK-Zellen des peripheren Blutes tragen Rezeptoren für den konstanten Teil (= Fc-Region) von IgG (FcR) (48, 194). NK ist also keine unspezifische Reaktion aller Lymphozyten oder einer klassischen Lymphozytensubpopulation, sondern an eine eigene mehr oder weniger distinkte Lymphozytenfraktion gebunden, die wegen des Mangels an T- und B-Zellmarkern als Null-Zellen bezeichnet wurde (95). Morphologisch gehören praktisch alle NK-aktiven Zellen des Menschen zu den sogenannten großen granulären Lymphozyten (LGL = large granular lymphocytes) mit geringer Dichte, relativ großem Zytoplasma und azurophilen Granula (184).

Weitere Studien haben gezeigt, daß NK-Zellen einige Merkmale mit anderen mononukleären Blut- und Lymphzellen, PBM (peripheral blood mononuclear cells), gemeinsam haben. So bilden Subpopulationen von NK-Zellen unter optimalen Bedingungen Rosetten mit Schaferythrozyten (48, 194) und reagieren entsprechend mit monoklonalen Antikörpern gegen den Schaferythrozytenrezeptor (132, 200). Sie tragen das Gangliosid Asialo-GM₁, wie auch Monozyten und Granulozyten (132). Ebenso reagieren NK-Zellen wie diese mit dem monoklonalen Antikörper OKM 1 gegen einen Complement-Rezeptor (13, 132, 200, 202). Ein Teil der NK-Zellen trägt Ia (entspricht HLA D/DR)-Antigene, wie B-Zellen, Makrophagen und aktivierte T-Zellen (68, 132). Über die Expression weiterer T-Zellantigene liegen z.T. widersprüchliche Berichte vor (13, 132). Des weiteren kann die Aktivität von NK-Zellen durch Interferon gesteigert werden

(siehe 1.4.), ebenso durch Interleukin 2 (59, 68), das als Vermittler-Substanz der Helfer-T-Zellfunktion wirkt und durch das T-Zellen zur Proliferation gebracht werden können. LGL produzieren auch selbst Interferon (108, 186). Einige monoklonale Antikörper, die mit NK-Zellen reagieren, scheinen ein relativ enges Reaktionsspektrum zu besitzen, doch gilt auch für sie, daß sie auch mit anderen Zellpopulationen reagieren (13, 132).

Die erwähnten Markerstudien deuten auf eine beträchtliche Heterogenität innerhalb der NK-Zellpopulation hin. Ob es sich dabei um verschiedene Stufen einer Differenzierungslinie handelt oder um parallele Differenzierung zu verschiedenen Phänotypen ist noch offen, ebenso wie ungeklärt ist, ob NK-Zellen als Vorstufen oder Nebenweg der T-Zellreihe (63) oder als Vorstufen von Makrophagen (103) oder als eigene Zellreihe zu betrachten sind.

1.3. Der Mechanismus der Lyse durch NK-Zellen

NK-aktive Zellen unterscheiden sich von klassischen zytotoxischen T-Zellen nicht nur im Phänotyp (siehe 1.2.) sondern auch im lytischen Mechanismus lassen sich Unterschiede finden (136, 147, 198). Wesentliche Merkmale der Lyse durch NK-Zellen sollen hier kurz aufgeführt werden.

Die Lyse durch NK-Zellen läßt sich zunächst in die Bindung der Target-Zellen - also der Zellen, gegen die sich der zytotoxische Angriff richtet - und den eigentlichen lytischen Vorgang untergliedern (153, 154). Studien mit verschiedenen Agentien wie Pharmaka, Antikörpern und zweiwertigen Kationen bzw. entsprechenden Chelatbildnern erlauben eine weitere Abgrenzung verschiedener Stadien gegeneinander (69, 70, 71): Nach der magnesiumabhängigen Bindung

der Targetzellen werden die Targetzellen in einem Prozeß "programmiert", der die Anwesenheit und wahrscheinlich auch den Einstrom von Ca^{2+} in die NK-Zellen erfordert. Die späte Phase dieses NK-Zell-abhängigen "programmings" ist Kalzium-unabhängig, ebenso wie eine letzte Phase, in der die Targetzellen lysieren, ohne daß ein enger Kontakt zu den Effektorzellen nötig ist. Während des Programmierungsschrittes scheint Oberflächenmaterial von den Effektorzellen auf die Targetzellen überzugehen und in der letzten Phase dort wirksam zu sein, da das Antiserum RH 2, das nur von Effektorzellen, nicht von Targetzellen absorbiert wird, die Chrom-Freisetzung aus programmierten Targetzellen im Chrom-Freisetzungstest hemmt (70). Ultrastrukturell bilden NK-aktive LGL zunächst eine Zone engen Kontakts mit den Targetzellen, entweder durch weitflächige Anlagerung an die Targetzellen, oder durch Pseudopodien, die in Einstülpungen der Targetzelloberfläche vordringen. Daraufhin orientiert sich der gut ausgeprägte Golgi-Apparat der Effektor LGL so, daß er zwischen Kern und Targetzelle zu liegen kommt. Monensin, ein Inhibitor der Vesikelwanderung vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran führt zur Akkumulation von großen Vesikeln in LGL, die an Targetzellen gebunden haben. Gleichzeitig hemmt es die NK-Aktivität der LGL (23). Diese Beobachtungen unterstützen das Stimulus-Sekretionsmodell von Roder et al. (147), der fand, daß durch Blockierung lysosomaler Enzyme ebenfalls eine Hemmung der NK-Aktivität erreicht werden kann. Wright und Bonavida (196, 197, 198) fanden zytotoxische Faktoren, die von stimulierten NK-Zellen in den Überstand abgegeben werden. Diese Faktoren binden selektiv an NK-sensible Zellen und führen zu deren Lyse. Mutanten ohne Rezeptoren für diese Faktoren können von NK-Zellen zwar gebunden, aber schlechter lysiert werden. Die Natur dieser Faktoren ist noch unklar. Makromolekulare Serinproteaseinhibitoren (75) und Hemmstoffe der Phospholipase A_2 (72) hemmen die NK-Lyse,

sodaß Proteolyse und Phospholipase-Aktivität als Wirkprinzip dieser zytotoxischen Faktoren denkbar wären.

Zusammengenommen führen diese Daten zu folgendem Modell der NK-Lyse (modifiziert nach 13):

1. Die NK-Zelle erkennt und bindet an die Targetzelle und formt durch Ausläufer einen engen Kontakt.
2. Der Golgi-Apparat orientiert sich auf das Target.
3. Vermittelt durch Kalziumeinstrom kommt es zur Degranulation und/oder gerichteten Freisetzung zytotoxischer Moleküle.
4. Diese binden an die Targetzellen und
5. lysieren sie unabhängig von der Anwesenheit der Effektorzelle.

Die Schritte 2. bis 4. dürften dem "programming" nach Hiserodt et al. (69-71) entsprechen, äquivalent zum "lethal hit" der Lyse durch CTL. Nach der Lyse der Targetzellen sind NK-Effektorzellen für längere Zeit nicht in der Lage, erneut an Targetzellen zu binden und diese zu lysieren (23, 185).

Roder et al. beobachteten auch eine Bildung und Freisetzung von oxidierenden Sauerstoffradikalen nach Kontakt von LGL mit NK-sensiblen Targetzellen. Dies erinnert an ähnliche Vorgänge bei Makrophagen und Granulozyten (1, 7). Der Abbau dieser Radikale durch Superoxiddismutase führt zwar zu einer verminderten NK-Lyse, ihre Produktion ist aber keine ausreichende Bedingung für die Lyse durch NK-Zellen. LGL NK-defizienter Chediak-Higashi-Patienten binden zwar mit normaler Frequenz an Targetzellen und produzieren daraufhin normal viele Radikale, es kommt aber dennoch nicht zur Target-Lyse (149, 155). So bleibt die Bedeutung dieses Phänomens für den Ablauf der Lyse noch unklar.

Interferon (IFN) steigert die NK-Aktivität gegen Zelllinien (25, 60, 174, 187) und frische Tumorzellen (190, 191) einschließlich Leukämiezellen (119, 138, 201).

Interferone sind "... Proteine, die, ohne spezifisch gegen ein bestimmtes Virus gerichtet zu sein, auf homologe Zellen durch Beeinflussung des zellulären Stoffwechsels der RNA- und Proteinsynthese eine antivirale Aktivität ausüben" (77). Nach antigenen Eigenschaften lassen sie sich in α -, β - und γ -Interferone bzw. nach ihrer Herkunft in Leukozyteninterferon, Fibroblasteninterferon und Immuninterferon unterteilen. Interferone hemmen nicht nur Virusreplikation, sondern beeinflussen auch das Wachstum maligner und normaler Zellen (46), wobei zumindest im hämatopoetischen System das maligne Wachstum stärker gehemmt wird, als das Wachstum normaler Zellen (9). Interferon vermindert die in-vivo Tumorigenität von in-vitro vorbehandelten Tumorzellen, beeinflusst die Dichte und Oberflächeneigenschaften von Zellen, wie z.B. MHC-Expression, erhöht die zytotoxische Aktivität von Makrophagen und zytotoxischen T-Lymphozyten (46, 139, 158, 182) und spielt möglicherweise in der Immunregulation, z.B. als Vermittler von Suppressor-Aktivität, eine wichtige Rolle (83). In-vivo kann Interferon einen Antitumoreffekt ausüben, der über die direkte Hemmung des Zellwachstums hinausgeht, und nicht von zytotoxischen T-Lymphozyten oder Makrophagen abhängig ist (46). Dieser Effekt wird heute der Steigerung der NK-Aktivität zugeschrieben.

Der Mechanismus, über den Interferon die NK-Aktivität steigert, konnte in jüngerer Zeit ebenfalls in den Grundzügen geklärt werden: Interferon erhöht unter den Targetzell-bindenden Effektorzellen die Zahl der lytisch aktiven Zellen ("Rekrutierung" von Prä-NK-Zellen (189)), erhöht die Geschwindigkeit des lytischen Prozesses und vermindert die Latenzphase, nach der NK-Zellen nach einem lytischen Prozeß an neue Targetzellen binden

und diese lysieren können (23, 185, 189). Während die Zahl der Effektorzellen, die an Zellen mit hoher NK-Sensitivität wie K 562 oder Molt 4 binden, durch Interferon nicht erhöht wird, wird die Zahl der Target-bindenden Effektorzellen bei einigen relativ NK-resistenten Targetzellen durch Interferon gesteigert (185).

Während der Effektor-Target-Zell-Interaktion mit einigen Targetzellen bilden NK-Zellen selbst Interferon (186). Die Interferonproduktion während des Testablaufs mit Interferon-induzierenden Targetzellen ist für das Ausmaß der Lyse dieser Targetzellen von wesentlicher Bedeutung. Daraus wird geschlossen, daß dem endogenen Interferonspiegel bei der Aufrechterhaltung der in-vivo NK-Aktivität eine zentrale Rolle zukommt (187, 190, 191). Dafür spricht auch, daß die NK-Aktivität von Spendern mit hoher Ausgangsaktivität in der Regel durch Interferon weniger gesteigert werden kann, als die Aktivität von Spendern mit geringer Ausgangsaktivität (60). Interferon-aktivierte NK-Zellen lysieren auch einige Targetzellen, die durch nicht aktivierte NK-Zellen nicht lysierbar sind (60). Ob es sich hierbei um einen kinetischen Effekt handelt, der durch eine erhöhte Anzahl von lytisch aktiven Zellen unter den bereits Target-bindenden NK-Zellen zustande kommt - wie aus den oben referierten Ergebnissen zu schließen wäre - , ob IFN neue NK-Klone rekrutiert oder IFN-aktivierte NK-Zellen unspezifisch ein breiteres Spektrum von Targetzellen binden und lysieren können (96, 98), oder ob die Effektivität des lytischen Apparates erhöht wird und dadurch der "spezifische" lytische Angriff mit größerer Wahrscheinlichkeit für die (relativ) resistente Targetzelle tödlich endet, ist noch nicht völlig geklärt.

1.4. Spezifität der Lyse durch NK-Zellen

Die Lyse von NK-suszeptiblen Zellen durch NK-Zellen ist nach Ansicht der meisten Autoren nicht spezifisch im Sinne der hohen Spezifität des T- oder B-Lymphozytensystems, in denen eine bestimmte antigen wirksame Struktur von einem Klon mit enger Spezifität erkannt wird und zu dessen Aktivierung und/oder Expansion führt. Die NK-Lyse ist aber insofern selektiv, als sie nicht alle Zelllinien gleichermaßen affektiert, sondern nur bestimmte Targetzellen lysiert werden und nur bestimmte Zellen die Lyse anderer NK-suszeptibler Zellen kompetitiv hemmen können. Für viele NK-resistente Zellen wurde gezeigt, daß ihre Sensibilität für die Lyse durch zytotoxische T-Lymphozyten nicht vermindert ist (47, 81, 130, 198). Dies spricht gegen das Argument (97, 98), daß die NK-Sensibilität von Zellen nur deren Sensibilität gegen unspezifische oder allospezifische T-Zell-Lyse widerspiegelt.

Das weite Spektrum der Zellen, die durch NK-Zellen erkannt werden, spricht dafür, daß NK-Zellen mit einer oder mehreren weit verbreiteten Oberflächeneigenschaft(en) oder -struktur(en) wechselwirken.

Untersuchungen insbesondere mit Zellabsorptionsverfahren und mit dem "cold-target-inhibition-assay" (CTI siehe 2.2.7), in dem die Fähigkeit verschiedener Zellen, die Lyse anderer Targetzellen kompetitiv zu hemmen, als Indikator dafür gilt, daß die lysierten und hemmenden Targets von derselben Effektorzellsubpopulation erkannt werden, weisen darauf hin, daß es mehrere Targetstrukturen gibt, die auf den suszeptiblen Targetzellen in unterschiedlichem Muster exprimiert werden und von verschiedenen NK-Subpopulationen mit teilweise überlappender Spezifität erkannt werden (60, 65, 99, 121, 122, 175).

Aus den Membranen NK-sensibler Zelllinien wurden mehrere Moleküle isoliert, die die Bindung der NK-Zellen an Targetzellen (146, 154) oder die Lyse der Targetzellen im Chrom-Freisetzungstest (124) teilweise hemmen und somit als NK-Targetstrukturen in Betracht kämen. Die Ergebnisse der beiden Studien im humanen NK-System (124, 146) sind allerdings widersprüchlich, was das Molekulargewicht und die xenogene Kreuzreaktivität betrifft, sodaß weitere Studien auf diesem Gebiet nötig sind.

NK-Zellen lysieren oder erkennen im CTI vor allem Tumor-Langzeit-Zelllinien verschiedener histologischer Herkunft (128, 131, 179), aber auch Kurzzeitzelllinien (128, 177, 179) und einige frische Tumoren (131, 190, 191) einschließlich Leukämien (119, 138, 201). Besonders NK-sensibel sind einige hämatopoetische Zelllinien und lymphopoetische Zelllinien, besonders T-Leukämie-Zelllinien (22, 130). Auch manche normale Gewebe sind NK-sensibel. Dazu gehören bei der Maus Makrophagen, fötale Fibroblasten, Knochenmarkzellen und Thymozyten (123). Die NK-Aktivität in Knochenmark, Blut, Milz und Thymus korreliert negativ mit dem Gehalt NK-suszeptibler Zellen in diesen Organen, ebenso die NK-Aktivität eines Individuums zu einem bestimmten Zeitpunkt mit der Proportion NK-suszeptibler Zellen in dessen Thymus (55). Da es sich bei den NK-sensiblen Thymozyten um relativ unreife Vorstufen handelt (53), spielen NK-Zellen möglicherweise eine wichtige Rolle in der Regulation der Lymphopoese und der Hämatopoese. Auch in humanem Knochenmark und fötalem Thymus wurden NK-sensible Zellpopulationen gefunden (54). Parallel zur Lyse autologer und allogener Knochenmarkzellen im Chrom-Freisetzungstest können NK-Zellen durch direkten Zellkontakt die Bildung granulozytärer und monozytärer Kolonien aus Knochenmarkzellen in-vitro hemmen (52). Die Targetzellpopulation im Knochenmark scheint daher einer relativ undifferenzierten, koloniebildenden Subpopulation anzugehören.

Durch Induktion von Differenzierungsvorgängen kann die NK-Suszeptibilität verschiedener Targetzellen reduziert oder erhöht werden (26, 37, 38). NK-Suszeptibilität ist also nicht nur an unreife Zellen gebunden. Vodinelich et al. (192) beschreiben eine enge Korrelation zwischen der Expression des Transferrinrezeptors und der Suszeptibilität von Zelllinien gegen NK-Zellen bzw. der Fähigkeit dieser Zelllinien, die NK-Lyse von K 562 im CTI zu hemmen. Fragmente des Transferrinrezeptors sind ebenfalls in der Lage, die NK-Lyse zu hemmen, sodaß für diesen Rezeptor eine Rolle als NK-Targetstruktur sehr wahrscheinlich ist. Da die Expression des Transferrinrezeptors mit der Proliferation normaler und maligner Zellen korreliert, impliziert diese Studie, daß NK-Zellen an der Kontrolle des Zellwachstums beteiligt sind. Dennoch sind maligne oder transformierte Zelllinien meist stärker NK-sensibel als normales Gewebe oder blastoide Zelllinien normaler Abstammung (27, 81, 131).

Die Theorien, daß NK-Zellen an der Immunsurveillance gegen malignes Wachstum oder aber an der Wachstumskontrolle per se beteiligt sind, schließen sich keineswegs gegenseitig aus. Vielmehr könnte eine zelluläre Wachstumskontrolle die Abwehr malignen Wachstums mit einschließen, oder primär diesem Zweck dienen.

Leukämiezellen sind mehr oder weniger uniforme Repräsentanten eines malignen hämatopoetischen oder lymphopoetischen Klonen (109, 195). Nach dem oben Erwähnten wäre zu erwarten, daß die aktiv proliferierenden Zellen des Knochenmarks und des Thymus der besonderen Kontrolle durch NK-Zellen unterliegen. Akzeptiert man die Immunsurveillance-/Wachstumsregulationstheorie, oder zumindest die Kontrolle des Knochenmarks und des lymphopoetischen Systems durch NK-Zellen, so ist es nicht verwunderlich, daß akute Leukämie-Zellen relativ NK-resistent sind (119, 201), da sie der postulierten Immunüberwachung auf irgendeine Weise entgehen mußten.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, daß einige NK-resistente Zelllinien durch Behandlung mit Zytostatika susceptibler gegen die NK-Lyse werden. Dies wurde in humanen (74) und Maus-NK-Systemen (27, 100) demonstriert. So sind zum Beispiel in-vitro transformierte Mausfibroblasten NK-sensibel, während die untransformierte Ausgangszelllinie relativ NK-resistent ist. Die Transformation führt zur Tumorigenität der Zellen in NK-defizienten Mäusen, nicht aber in normalen Mäusen. Längere Passage in NK-defizienten und dann in normalen Mäusen führt zur Entwicklung und Selektion NK-resistenter Zellen, die auch in normalen Mäusen tumorigen sind. Die NK-Resistenz dieser Zelllinien kann durch Proteinsynthesehemmer überwunden werden. In der vorliegenden Studie untersuchten wir, ob die NK-Resistenz frischer humaner Leukämiezellen durch Zytostatika überwunden werden kann. Die hier vorgelegten Daten zeigten erstmals, daß die NK-Lyse frischer, nicht an Zellkulturbedingungen adaptierter Leukämiezellen durch Actinomycin D als Modells substanz gesteigert werden kann.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

Plastikmaterial:

15 ml Plastikröhrchen mit konischem Ende und 0,1 ml

Gradierung: No. 2095, Falcon, Oxnard, Ca., USA

Zellkulturflaschen: No. 3013, Falcon

96-Loch Mikrotest-Platten mit rundem Boden: verschiedene
Firmen

Einfriergerät: Planer PTC 200, Planer, Sunberry-on-Thames, UK.

Chemikalien:

Act D: Actinomycin D, Calbiochem-Behring Corp.,
La Jolla, Ca., USA
200 µg lyophilisiert pro Ampulle, aufgelöst in
10 ml RPMI/FCS und bis zu 3 Wochen im Kühlschrank
bei 4°C lichtgeschützt gelagert

Chrom: Na₂⁵¹CrO₄, New England Nuclear, Dreieich, BRD

DMSO: Dimethylsulfoxid, Merck, Art. 2931

Ficoll: Ficoll 400, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala,
Schweden

Heparin: Novo-Heparin zur i.v. Infusion, Novo Industrie
GmbH, Pharmazeutika, Mainz

PHA: Phytohämagglutinin P, Difco Laboratories, Detroit,
Michigan, USA

Penicillin - Streptomycin-Lösung: 10 000 U Penicillin und
10 000 U Streptomycin pro ml, Gibco Biocult

Urovison: Schering

Interferon: Humanes Fibroblasteninterferon, zur Verfügung ge-
stellt von Dr. von Eichborn, Rentschler, Laup-
heim, BRD, in Aliquots zu 3000 U/0,3 ml RPMI/FCS
bei -70°C gelagert.

Medien:

FCS: Fötales Kälberserum, Gibco, für 30 min bei 56°C
inaktiviert

PBS: (= Phosphate buffered saline)
50,6 g $\text{NaHPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
12,17 g KHPO_4
21,92 g NaCl
ad 5000 ml Aqua dest.

RPMI 1640: Gibco Biocult, als Pulver geliefert und von der
Apotheke der Poliklinik der Universität zuberei-
tet

PBS/FCS: 500 ml PBS + 12,5 ml FCS (= 2,5%)

RPMI/FCS: 500 ml RPMI + 55 ml FCS
+ 5 ml L-Glutamin 200 mM
+ 10 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung

Einfriermedien:

1. 80 Vol% RPMI, 20 Vol% FCS
2. 60 Vol% RPMI, 20 Vol% FCS, 20 Vol% DMSO

Ficoll-Urovison (FU): 38,72 g Ficoll 400
+500 ml Aqua bidest.
+104,7 ml Urovison

Zellen:

Leukämiezellen: Blut von Leukämie-Patienten ohne vorherige
Behandlung wurde uns von Dr. B. Emmerich, Krankenhaus rechts
der Isar, München, Dr. B. Netzel, Haunersches Kinderspital,
München, Dr. W. Siebert, Medizinische Klinik III, Klinikum
Großhadern, München und Dr. H. Thelml, Städtisches Kranken-
haus München-Schwabing, zur Verfügung gestellt. Prof. Rieber,
Institut für Immunologie, stellte die schon eingefrorenen
Zellen (s.u.) zur Verfügung. Die Diagnose wurde von den Kli-
niken übernommen. Von allen Leukämiezellen wurden in diese

Studie nur die aufgenommen, die im Differentialblutbild mehr als 85% Blasten hatten.

Diagnosen:

Hu : akute myelomonozytäre Leukämie (AMML)

Mi : akute myeloische Leukämie (AML)

Rd : AML

Ri : chronisch myeloische Leukämie im Blastenschub (CML-BC)

Sc : AML

St : akute lymphatische Leukämie (ALL)

Su : CML-BC

Vg : akute undifferenzierte (non B- non T-) lymphatische Leukämie, common ALL-Antigen (cALLA) positiv

Zelllinien:

K 562 wurde aus dem Pleuraexsudat eines Patienten im Blastenschub einer chronisch myeloischen Leukämie etabliert (106). Sie trägt das Philadelphia-Chromosom (107) und besitzt granulopoetische und besonders erythropoetische Differenzierungspotenz (101, 110). Während K 562 lange als HLA-negativ galt (141), wurden kürzlich HLA-Moleküle auf der Oberfläche gefunden (203, 204).

Molt 4 wurde aus den Leukämiezellen eines Patienten mit akuter T-Zell-Leukämie etabliert (116) und entspricht phänotypisch einem sehr frühen Thymozyten (115).

K 562 und Molt 4 sind besonders NK-sensibel (80, 141, 142) und werden als Standard-Targetzellen für NK-Tests verwendet.

P 815 wurde von einem mit Methylcholanthren induzierten DBA/2 Maus-Mastozytom isoliert (31). Bei manchen Autoren gilt P 815 als Paradebeispiel einer NK-resistenten Zelle (118), während Pross und Jondal (80, 142) sie zu den "slow targets" rechnen, da sich eine Lyse durch NK-Zellen erst nach ca. 4 h messen läßt (80, 143), während die Lyse von z.B. K 562 schon nach Minuten beginnt.

2.2. Methoden

2.2.1. Blutentnahme

2.2.1.1. Patientenblut

15 - 20 ml Heparinblut wurde den Patienten in der jeweiligen Klinik abgenommen und in der Spritze sofort mit dem Taxi ins Institut für Immunologie gebracht. Bis zur Separation wurde das Blut für maximal eine Stunde im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

2.2.1.2. Blut gesunder Spender

50 - 400 ml Blut wurden im Insitut für Immunologie mit 60 ml-Spritzen (Becton Dickinson & Co. Ltd) abgenommen, deren Konus vorher mit konservierungsmittelfreiem Heparin zur IV-Infusion (novo) gefüllt worden waren.

2.2.2. Separation des Blutes

Patienten- und Spenderblut wurde bei der Separation gleich behandelt.

Das Blut wird mit dem ein- bis zweifachen Volumen an PBS verdünnt und im Separationsgefäß (50 ml Plastikröhrchen oder 80 ml Glasgefäße mit rundem Boden) langsam über eine drei bis vier Zentimeter hohe Ficoll-Urovison (FU)-Lage geschichtet. Anschließend werden die Gefäße 30 min lang bei 800 g und Raumtemperatur (22°C) zentrifugiert.

Diese Methode ist eine Modifikation des von Böyum angegebenen Verfahrens (15). Zunächst sinken alle Blutzellen bis zur Trennfläche zwischen verdünntem Blut und FU. Hier bilden sich

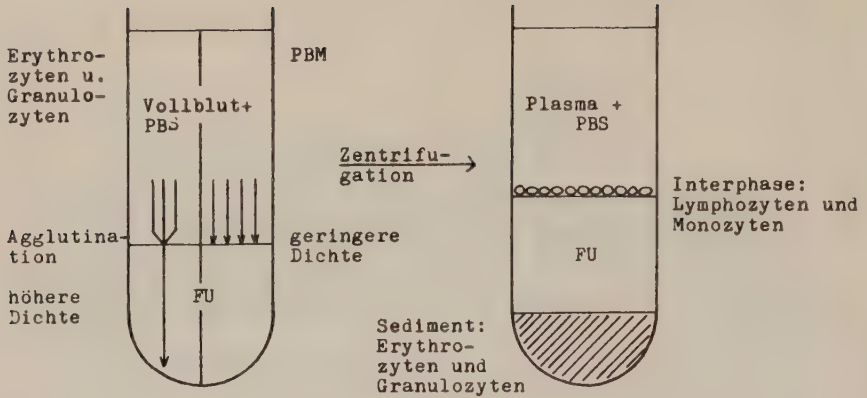


Abbildung 2.1. Prinzip der Ficoll-Separation

Mit PBS verdünntes heparinisiertes Blut wird über eine Lage Ficoll-Urovison (FU) geschichtet und zentrifugiert. Alle Blutzellen sedimentieren zur Blut/Ficoll-Interphase, wo Erythrozyten und Granulozyten aggregieren und auf Grund ihrer höheren Dichte weiter durch die FU-Schicht sedimentieren, um sich im Pellet zu sammeln, während sich mononukleäre Blutzellen als Zellage an der Interphase zwischen FU und dem verbleibenden PBS-Plasmagemisch sammeln.

durch Vernetzung mit Ficoll Erythrozyten-Granulozyten-Aggregate, die aufgrund ihrer höheren Dichte bzw. wegen der aufgrund der geringeren osmotischen Resistenz gegenüber der hyperosmolaren FU-Lösung erhöhten Dichte, auch durch die Ficoll-Urovison-Schicht (Dichte 1,077 g/ml) sedimentieren. Die Erythrozyten-Aggregate sinken auch bei Erdbeschleunigung (1 g) sichtbar ab, durch die Zentrifugation wird dies aber wesentlich beschleunigt und die Reinheit der PBM-Fraktion erhöht. Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBM) werden durch Ficoll nicht vernetzt. Wegen ihrer höheren osmotischen Resistenz und der resultierenden geringeren Dichte als 1,077 g/ml sammeln sich Lymphozyten und Monozyten (auch Basophile) an der Interphase zwischen FU und dem Plasma-PBS-Gemisch. Dasselbe gilt für alle mononukleären Vorstufen der verschiedenen Zellreihen, also auch für leukämische Parablasten. Die Plättchenfraktion sammelt sich ebenfalls in der Interphase.

Mit einer Saugpipette können die Zellen der Interphase leicht gewonnen werden.

Durch unspezifische Einbindung in die Erythrozyten-Aggregate geht ein gewisser Anteil der Lymphozyten verloren, der durch stärkere Verdünnung des Blutes, also durch Senken der Erythrozyten-Konzentration, vermindert werden kann (15). Da es hier aber nicht um einen Vergleich verschiedener Zellzahlen bei den Spendern ging, richtete sich die Blutverdünnung mit PBS nach dem zu verarbeitenden Blutvolumen. Große Volumina wurden schwächer verdünnt (1:1) als kleinere (1:2).

Nach dem Gewinnen der Interphasenzellen werden sie dreimal durch Zentrifugation und Resuspension in PBS/FCS gewaschen. Beim ersten Waschen werden die Zellen mit 800 g zentrifugiert, da beim Aufnehmen der Zellen von der Interphase FU mitgenommen wird und so der Dichteunterschied zwischen Zellen und Medium

geringer ist. Weitere Waschungen erfolgen mit 400 g für 10 min. Durch diese Waschungen wird FU entfernt und der Anteil der Plättchen vermindert.

Nach der dritten Zentrifugation werden die Zellen in RPMI/FCS aufgenommen, mit Trypan-Blau gezählt und auf die gewünschte Zellzahl eingestellt.

Die so gewonnenen Zellen werden als PBM bezeichnet, wenn sie aus dem Blut normaler Spender isoliert wurden, und als leukämische Blutzellen, LBC, oder Blasten, wenn sie von Leukämie-Patienten stammen.

Die Zellausbeute lag bei gesunden Spendern zwischen 0,5 und $2,7 \times 10^6$ PBM/ml Blut und entsprach damit den üblichen Ergebnissen mit dieser Methode in diesem Labor.

2.2.3. Cryopräservation von normalen Blutzellen und Leukämiezellen

2.2.3.1. Einfrieren der Zellen

PBM oder LBC, die nicht am Tag der Separation bei einem Versuch eingesetzt wurden, wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Das betraf PBM aus größeren Blutmengen und LBC, die bei mehreren Versuchen Verwendung finden sollten und oft erst am späten Nachmittag geschickt wurden.

Zum Einfrieren werden die separierten PBM oder LBC nach dem letzten Waschen nach der Separation in RPMI mit 20% FCS aufgenommen, auf das Doppelte der zum Einfrieren erwünschten Zellkonzentration ($20-100 \times 10^6/\text{ml}$) eingestellt und in Eiswasser auf 0°C gekühlt. Zu dieser Zellsuspension wird das gleiche Volumen an eiskaltem RPMI mit 20% FCS und 20% DMSO zugetropft, wobei das Gefäß mit den Zellen sanft in Eiswasser geschwenkt wird. Dadurch steigt die Konzentration von DMSO nur langsam auf 10 Vol% an und die Temperatur bleibt konstant. Durch die Kühlung bleibt der toxische Effekt des DMSO auf die Zellen gering (24, 73).

Die Zellsuspension muß nun sofort auf ebenfalls vorgekühlte verschraubbare 2 ml Plastikröhrchen zu je 1 ml verteilt, diese verschlossen und in den ebenfalls vorgekühlten Einfrierapparat eingebracht werden. In ein Röhrchen mit Zellsuspension wird eine Temperaturmeßsonde eingebracht, die die aktuelle Temperatur laufend registriert. Der Einfrierapparat bringt die Zellsuspension mit programmgesteuerter Einfrierrate unter ständigem Vergleich der Soll-Temperatur mit der tatsächlichen auf -90°C . Das hier verwendete Programm 16 wurde von Dr. R. Wank, Institut für Immunologie, empirisch ausgearbeitet und soll auf Arbeiten von Jewett beruhen.

Biologisches Einfrierprogramm Nr. 16:

1. Abkühlung auf -1°C (Vorkühlung ohne Zellen)
2. Konstante Temperatur -1°C für 15 min (Wartephase zum Einbringen der Zellen, kann nach Einbringen der Zellen abgekürzt werden)
3. Abkühlung um $-1,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis -11°C
4. Abkühlung um $-22^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis -33°C
5. Konstante Temperatur bei -33°C für 10 min
6. Abkühlung um $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis -45°C
7. Abkühlung um $-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis -60°C
8. Abkühlung um $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis -90°C
9. Konstanthalten der Temperatur bis zur Entnahme der Zellen.

Nach Erreichen der Temperatur von -90°C werden die Zellen schnellstens in einen Stickstoffcontainer transferiert, wo sie im flüssigen Stickstoff (-196°C) oder in der darüber befindlichen Gasphase beliebig lange lagern können (40).

DMSO wirkt als cryoprotektive Substanz (105, 114). Es wurde von Ashwood-Smith erfolgreich zum Einfrieren von Maus-Knochenmark (3,4) und Lymphozyten (5) mit Erhalt vieler Funktionen verwendet. Seither hat sich DMSO als Cryoprotektivum in der Immunologie etabliert (11, 24, 30, 73, 78, 127).

DMSO erniedrigt den Gefrierpunkt einer Zellsuspension und reduziert so aus thermodynamischen Gründen die beim Gefrieren des Lösungswassers möglichen Schäden. Es vermindert den auskristallisierenden Anteil des Lösungswassers (insbesondere intrazellulär), fördert die Bildung "amorphen Eises", reduziert so osmotische Schäden, die durch die Konzentrierung des noch nicht gefrorenen Mediums bei der Auskristallisation des Eises entstehen und beeinflusst die Dynamik der Flüssigkeitsbewegungen zwischen Intra- und Extrazellulärraum, wodurch der "osmotische Streß" vermindert wird, der während

des Auskristallisierens auf die Zellmembran wirkt (6, 34, 114). Die Bedeutung dieser Mechanismen für die schützende Funktion des DMSO ist allerdings im einzelnen noch nicht ganz geklärt.

Beim Abkühlen sinkt die Temperatur der Zellsuspension zunächst unter den Gefrierpunkt, ohne daß Eis auskristallisiert (Supercooling) und steigt dann bei Beginn des Auskristallisierens wieder an bis zum Gefrierpunkt, wenn nicht durch eine veränderte Kühlrate gegengesteuert wird. Die beim Phasenübergang frei werdende Schmelzwärme verlängert den Phasenübergang und damit die für die Zellen kritische Phase des Auskristallisierens. Von dieser Überlegung ausgehend wird in Schritt 4 des verwendeten Einfrierprogrammes in kurzer Zeit eine große Wärmemenge abgeführt, um den Phasenübergang zu verkürzen und die möglichen Schäden durch ein schnelles Erreichen thermodynamisch günstigerer Temperaturen zu vermindern. Nach Foreman und Pegg (35) soll die Effektivität eines Einfrierverfahrens allerdings nicht mit der schnellen Überwindung des Phasenüberganges korrelieren.

2.2.3.2. Auftauen der Zellen

Die Aliquots werden aus dem Stickstofftank geholt und sofort im 37°C Wasserbad aufgetaut. Dabei wird das verschlossene Röhrchen ständig geschüttelt, was den Temperatureausgleich beschleunigt. Kurz bevor das letzte Stückchen Eis schmilzt, wird die Zellsuspension in ein 50 ml Plastikröhrchen transferiert und mit RPMI/FCS von Raumtemperatur tropfenweise unter ständigem Schwenken auf etwa 30 ml langsam hochverdünnt. Nach Oldham et al. (127) bleiben die Lymphozyten durch langsames Verdünnen funktionell am besten erhalten. Raumtemperatur des Verdünnungsmediums ist einer Temperatur von 4°C vorzuziehen. Nach dem Verdünnen werden

die Zellen für sieben Minuten bei 400 g sedimentiert und einmal mit PBS/FCS gewaschen, anschließend im RPMI/FCS aufgenommen und die Zellzahl je nach Verwendungszweck eingestellt. Von hier an werden die Zellen wie frische Zellen behandelt. Zellen, die nach Cryopräservation verwendet wurden, sind im Folgenden mit * gekennzeichnet.

2.2.4. Behandlung der Targetzellen mit Actinomycin D

LBC, PBM, PHA-Blasten (siehe 2.2.8.) oder Zelllinien werden in Falcon tissue culture flasks 3013 zu 5 bis 10×10^6 , 1×10^6 /ml, mit verschiedenen Konzentrationen Actinomycin D (Act D) oder ohne Act D angesetzt und im Brutschrank in Wasserdampf-gesättigter, mit 5% CO₂ angereicherter Atmosphäre bei 37°C inkubiert. Für den Standard-Test wurden die Zellen in den ersten Experimenten für vier Stunden inkubiert, vor dem Chromieren (siehe 2.2.6.2.) gewaschen und in Act D-freiem Medium chromiert. Für die meisten Tests wurden die Targets jedoch nur zwei Stunden vor dem Chromieren im Brutschrank inkubiert und danach im selben Medium chromiert, so daß die Einwirkungszeit des Act D auch hier 3 1/2 bis 4 h betrug.

Zellen, die mit Act D inkubiert worden sind, werden mit "+Act D" gekennzeichnet, Kontrollzellen, die parallel ohne Act D inkubierten, mit "-Act D".

2.2.5. Aktivierung der Effektorzellen mit Interferon

Humanes Fibroblasten-Interferon (IFN) war im Institut in Aliquots von 3000 U/300 µl bei -70°C gelagert. PBM werden in 50 ml Plastikröhrchen auf 4×10^6 Zellen/ml eingestellt und mit 50 µl IFN/ml entsprechend 500 U/ml Endkonzentration versetzt. Die Zellen werden für 1-2 h im Brutschrank (siehe 2.2.4.) inkubiert. Besonders bei kurzer Inkubationszeit soll

sich nicht zuviel Volumen in einem Röhrchen befinden (etwa 15 ml), damit auch das Medium am Boden, wo sich die meisten Zellen befinden, durch das CO_2 der Brutschrankatmosphäre auf den richtigen pH-Wert eingestellt wird. Nach der Aktivierung werden die Zellen zweimal mit PBS/FCS gewaschen. Vergleichszellen (-IFN) werden in gleicher Weise behandelt, jedoch werden sie ohne Interferon inkubiert.

2.2.6. Der ^{51}Cr -Freisetzungstest = CRA (Chromium release assay)

2.2.6.1. Prinzip des CRA

Der Chrom-Freisetzungstest (18, 19) ist als Standardmethode für die in vitro Messung zellvermittelter zytotoxischer Aktivität auch für die Messung der NK-Zellaktivität etabliert (79 u.a.). Wenn auch viele Modifikationen Verwendung finden, ist doch das Prinzip immer dasselbe. Die angegriffenen "Target-Zellen" werden vor dem Test mit radioaktivem $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ inkubiert. Das Chromat gelangt in die Zellen und bindet relativ fest an intrazytoplasmatische Proteine. Nach Auswaschen des extrazellulär verbliebenen Chroms werden die Target-Zellen mit den Effektorzellen in verschiedenen Effektor-zu-Target-Verhältnissen (E:T) zusammengebracht. Durch die zytolytische Aktivität der Effektorzellen werden mehr oder weniger viele Targetzellen zerstört. Dabei gelangen zytoplasmatische Proteine mit dem gebundenen ^{51}Cr ins Medium. Diese als Gamma-Radioaktivität im zellfreien Überstand meßbare Chrom-Freisetzung ist ein Maß für die Schädigung der Targetzellen. Je nach Fragestellung erlaubt ihr Ausmaß eine Aussage über die zytolytische Kapazität der Effektorzellen gegen die getesteten Targetzellen oder über die Empfindlichkeit der Targetzelle gegenüber dem Angriff der Effektorzellen.

2.2.6.2. Markierung der Targetzellen mit ^{51}Cr -Chromat

Die Targetzellen (LBC, PBM etc.) werden in RPMI/FCS in spitzkonisch endenden 15 ml Plastikröhrchen mit 0,1 ml Grädierung (Falcon Nr. 2095) mit 400 g sedimentiert und der Überstand bis auf verbleibende 0,2 ml abgenommen. Zur Markierung wird jedes Röhrchen mit 20-30 μl Natrium-Chromat-Lösung ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ und Na_2CrO_4 in physiologischer NaCl -Lösung) versetzt. Die spezifische Aktivität der Chromat-Lösung am Bezugstag wird auf 5 mCi/ml eingestellt. Die Aktivität zur Markierung der Zellen soll ca. 100 μCi betragen. Deshalb wurde 2-3 Wochen nach dem Bezugsdatum mehr ($> 22\mu\text{l}$) Chromlösung verwendet (die Halbwertszeit von ^{51}Cr ist 27,8 Tage). Nach Resuspendierung der Zellen werden die Röhrchen für 1 1/2 (in den ersten Experimenten für 2 h) im Brutschrank bei Wasserdampf gesättigter Atmosphäre, 37°C und 7% CO_2 inkubiert und alle 10-30 min aufgeschüttelt, was die Chromaufnahme verbessern soll (36). Nach der Inkubation werden die Zellen viermal mit PBS/FCS gewaschen, in RPMI/FCS aufgenommen und nach Zählung mit Trypan-Blau auf 10^5 lebende Zellen/ml eingestellt.

Actinomycin D-vorbehandelte Zellen wurden im Act D-haltigen Medium markiert, in dem sie vorinkubiert worden waren, und die Zeit der Chromierung auf die Act D-Behandlungszeit angerechnet (siehe 2.2.4.). Dasselbe gilt für die Kontrollen ohne Act D.

2.2.6.3. Ansetzen der Testplatten

Für die hier zu besprechenden Experimente wurde der CRA in 250 oder 300 μl 96-Loch Mikrotiterplatten mit U-förmigen Boden angesetzt.

Auf der Platte (seltener in Plastikröhrchen) werden mit 1 : 2 - gelegentlich 1 : 3 - Verdünnungsschritten Verdünnungsreihen der Effektorzellen angelegt. Das Volumen der Effektorzellsuspensionen beträgt 100 µl/Loch. Für jede Titrationsstufe werden drei Löcher mit gleicher Effektorzellzahl zur Dreifachbestimmung angesetzt. Zu den Effektorzellen werden jeweils 100 µl der eingestellten Lösung der ^{51}Cr -markierten Targetzellen gemischt. In 6 Löchern werden 100 µl Targetzelllösung mit 100 µl Medium ohne Effektorzellen vermischt, zur Bestimmung der spontanen Chrom-Freisetzung als Hintergrundaktivität. In weiteren 6 Löchern wurde für einen Teil der Experimente 100 µl Targetzelllösung mit 100 µl des Detergens Triton X 100 5% angesetzt, um so die maximale durch Detergentien erreichbare Chrom-Freisetzung zu bestimmen. Für einen einfachen Test befinden sich in einer Platte also z.B.

1. Hintergrundkontrolle: In 6 Löchern je 10^4 Targetzellen in 200 µl Medium
2. Maximale Chromfreisetzung: In 6 Löchern je 10^4 Targetzellen in 100 µl Medium + 100 µl Triton X 100 5%
3. Testreihe:

In je 3 Löchern mit 10^4 Targetzellen in 200 µl Medium			
+ 100	x 10^4	Effektorzellen $\Rightarrow$ E : T =	100 : 1
+ 50	x 10^4	" $\Rightarrow$ "	50 : 1
+ 25	x 10^4	" $\Rightarrow$ "	25 : 1
+ 12,5	x 10^4	" $\Rightarrow$ "	12,5 : 1
+ 6,25	x 10^4	" $\Rightarrow$ "	6,25 : 1
+ 3,12	x 10^4	" $\Rightarrow$ "	3,12 : 1

Die Platte wird dann 5 min lang mit 100 g zentrifugiert, damit die Zellen schneller in engen Kontakt kommen, und anschließend für 5 - 6 h im Brutschrank inkubiert (siehe 2.2.6.2.). Nach der Inkubation werden je 100 µl des Überstandes mit einer automatischen Pipette abgenommen und dessen Aktivität im Gamma-Counter bestimmt.

2.2.6.4. Auswertung des CRA

Die spezifische Chrom-Freisetzung SR in % bei einem bestimmten Effektor-zu-Target-Verhältnis E : T errechnet sich zu

$$SR [\%] = \frac{E - S}{M - S} \times 100 \quad (\text{Formel 1})$$

E ist der Mittelwert der Aktivität in den Überständen eines Triplikats mit dem Effektor-zu-Target-Verhältnis E : T, S der Mittelwert der 6 Messungen der spontanen Chrom-Freisetzung und M der Mittelwert der 6 Bestimmungen der maximalen Chrom-Freisetzung. SR ist also der spezifisch durch die zytolytische Wirkung der Effektorzellen freigesetzte Anteil der spezifisch freisetzbaren Chrommenge. Von E und M muß jeweils S abgezogen werden, da nur M - S für eine spezifische Freisetzung zur Verfügung steht und nur E - S als spezifisch betrachtet werden kann.

Während M anfangs mit Triton X 100 5% bestimmt wurde (siehe 2.2.6.3.), sind wir in späteren Experimenten dazu übergegangen, M durch direkte Messung der gesamten Aktivität in 100 µl Targetzelllösung zu bestimmen. Der so erhaltene Wert muß durch 2 geteilt werden, da die Aktivität in 100 µl Überstand nur der Hälfte des eingesetzten Chroms entspricht. SR-Werte, die auf beide Weisen bestimmt wurden, unterscheiden sich nur unwesentlich voneinander. Nach Herberman et al. (67) unterliegt die Lyse durch Detergentien großen Schwankungen und ist somit als Bezugspunkt weniger geeignet als die gesamte Chromaufnahme der Zellen.

2.2.7. "Cold-Target-Inhibition-Assay"

Ortiz de Landazuri und Herberman beschrieben eine Methode, die es erlaubt, zu untersuchen, ob der zytolytische Effekt einer heterogenen Effektorzellpopulation gegen verschiedene Targetzellen durch dieselbe Effektorzellsubpopulation verursacht wird und somit - zumindest bei zytotoxischen T-Lymphozyten - gegen dieselbe Targetstruktur auf verschiedenen Zellen gerichtet ist (64, 133).

Gibt man beim CRA zu einer konstanten Anzahl Effektorzellen und ^{51}Cr -markierter Targetzellen zunehmende Zahlen von unmarkierten Targetzellen, so werden die unmarkierten Targetzellen mit den markierten um die Erkennungsstrukturen und den Lysemechanismus der Effektorzellen konkurrieren. Die "kalten" unmarkierten Targetzellen hemmen also die spezifische Chrom-Freisetzung aus den "heißen" markierten Targetzellen. Desgleichen werden auch andere unmarkierte Zellen, die mittels derselben Targetstrukturen wie die markierten Targetzellen von denselben Effektorzellen erkannt werden, die Chrom-Freisetzung aus den markierten Zellen vermindern, da sie ebenso um den Rezeptor und den Lysemechanismus konkurrieren.

Wir haben den "Cold-target-inhibition"-Test (CTI) in folgender Weise durchgeführt:

In Mikrotiterplatten mit 300 μl -Löchern werden Verdünnungsreihen mit den kalten Inhibitorzellen angesetzt. Dazu kommen 5×10^3 oder 1×10^4 markierte Targetzellen und eine konstante Anzahl an Effektorzellen. Die spontane Chrom-Freisetzung und die gesamte Chrom-Freisetzung werden wie in 2.2.6.3. bzw. 2.2.6.4. bestimmt. Das Endvolumen in jedem Loch beträgt 250 oder 300 μl . Nach der Inkubation im Brutschrank (siehe 2.2.6.3.) wird bei der Ernte jeweils die Hälfte des Volumens vom Überstand abgenommen und dessen Aktivität gemessen. Die spezifische Chrom-Freisetzung bei einem

bestimmten Verhältnis von Inhibitor- zu Targetzellen (I:T) wird nach Formel 1 (2.2.6.4.) berechnet.

Bei einigen Experimenten wurde die spontane Chrom-Freisetzung ohne Effektorzellen in Anwesenheit der verschiedenen Mengen an Inhibitorzellen für jedes I:T individuell bestimmt.

2.2.8. Stimulation von PBM mit Phytohämagglutinin P

5×10^6 PBM werden in 5 ml RPMI/FCS mit 5 $\mu\text{g/ml}$ Phytohämagglutinin P (PHA) versetzt und unter sterilen Bedingungen für 3 Tage im Brutschrank bei feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre mit 5% CO_2 inkubiert.

PHA ist ein polyklonaler T-Zell-Aktivator. Es bringt einen beträchtlichen Teil der T-Zellen zur Proliferation und führt zu damit verbundenen "blastoiden" morphologischen Veränderungen.

3. Ergebnisse

3.1. Lyse von frischen und eingefrorenen AL-Blasten durch mononukleäre Zellen des peripheren Blutes

Bisher wurde in der Literatur wenig über die Lysierbarkeit frisch aus dem Blut von Leukämie-Patienten isolierter AL-Blasten durch NK-Zellen berichtet (119, 201). In den vorliegenden Studien zeigten die meisten Leukämie-Zellpopulationen eine geringe Empfindlichkeit für die spontane Lyse durch PBM. Im Rahmen umfangreicherer Experimente (3.2.2.4., Tab. 3.6.) testeten wir im Chrom-Freisetzungstest (CRA) bei zehn Effektor-Target-Kombinationen die Lysierbarkeit frisch isolierter, also nicht an Zellkulturbedingungen angepaßter, AL-Blasten durch PBM gesunder Spender. In nur drei dieser zehn Kombinationen zeigten die PBM eine deutliche lytische Aktivität gegen die Leukämie-Zellen. Als Kriterien für spezifische Lyse der Target-Zellen durch die Effektor-Zellen legten wir fest: eine 1. Effektorzell-dosis-abhängige spezifische Chrom-Freisetzung von 2. mindestens 5% nach Formel 1 (2.2.6.4.) bei einem Effektor-zu-Target-Verhältnis von höchstens 40:1 bis 50:1.

Gegen die ALL-Zellen Vg* zeigte einer von sechs Spendern Aktivität, gegen die AMML-Zellen Sc* einer von zwei Spendern und die AML-Zellen Ri waren sofort nach der Separation durch PBM des Spenders Ma lysierbar und nach Lagerung in flüssigem Stickstoff durch die PBM des Spenders Jo* nicht lysierbar. Vg* und Sc*-Zellen wurden in den erwähnten Experimenten nur nach Lagerung im Stickstofftank (*) getestet. Alle Targets wurden vor dem Test für zwei Stunden in RPMI/FCS inkubiert (2.2.4.) und für 1 1/2 Stunden chromiert (siehe 2.2.6.2.), die Effektorzellen inkubierten vor dem Test für 1-2 h in RPMI/FCS (2.2.5.). Abb. 3.1. zeigt vier der im CRA gemessenen Titrationskurven.

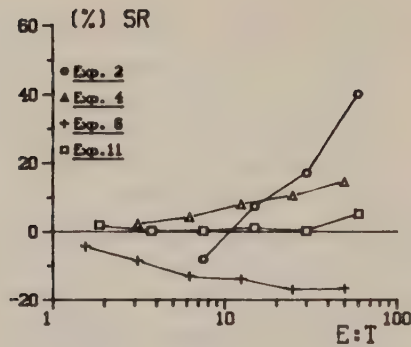


Abb. 3.1.: Zellvermittelte Chrom-Freisetzung aus AL-Zellen
Die LBC Ri (Exp. 4), Sc* (Exp. 11) und Vg*
(Exp. 2 und 6) wurden für 4 h in Medium inkubiert
und nach Markierung mit ^{51}Cr mit PBM normaler
Spender gemischt. Die PBM sind sequentiell 1:2
verdünnt. Die spezifische Chrom-Freisetzung ist
linear gegen das Effektor-zu-Target-Verhältnis
E:T (in logarithmischer Skala) aufgetragen.

Die spezifische Chrom-Freisetzung (SR = specific chromium release, siehe 2.2.6.4.) ist linear gegen das jeweils wirk-same Verhältnis von Effektor- zu Target-Zellen (logarithmi-scher Maßstab) aufgetragen.

Die Experimente 2 und 4 zeigen eine deutliche Effektorzell-dosis-abhängige Lyse der AL-Zellen Vg* (Exp 2) und Ri (Exp 4), wobei die Titrationskurve in Exp 2 bei niedrigem E:T im negativen Bereich beginnt. In Exp 11 verläuft die Titrationskurve quasi auf der Nulllinie, d.h. die Effektorzellen Ro setzen aus den Sc*-Targetzellen kein Chrom frei. In Experiment 6 liegt die Lyse im negativen Bereich, SR nimmt mit steigender Effektorzellzahl ab, wird also negativer. Entsprechend 2.2.6.4. bedeutet das, daß in Anwesenheit der PBM Di* die Vg*-Zellen weniger Chrom freisetzen als im Ansatz mit Medium ohne Effektor-Zellen zur Bestimmung der spontanen Chrom-Freisetzung S. Dieser Effekt ist als Schutzeffekt zu interpretieren. Durch die dichte Zusammenballung und/oder die Produktion von Faktoren durch die PBM - die hier offensichtlich wenig oder keine zytolytische Aktivität gegen die Target-Zellen aufweisen - wird die Überlebensfähigkeit der Target-Zellen verbessert. Naturgemäß zeigt sich ein deutlicher Schutzeffekt am ehesten bei einer hohen spontanen Chrom-Freisetzung S. Leider zeigte besonders die Target-Zelle Vg*, die uns am ersten zur Verfügung stand und die wir daher besonders ausführlich untersuchten, ein relativ hohes S von 28-51% der gesamten Chrominkorporation. Tabelle 3.1. zeigt die Werte für die spontane Chrom-Freisetzung für alle in dieser Arbeit getesteten Leukämien.

Tabelle 3.1.: Spontanrelease der akuten Leukämie-Zellen ohne Act D-Behandlung im 6 h CRA.

* = nach Lagerung in flüssigem Stickstoff.

Target	S
Vg*	27,9 - 43 % (-51,1% in Exp. 33)
Sc	6,0 %
Sc*	15,2 - 16,9%
Ri	5,7 %
Ri*	13,4 - 22,9%
St*	33,0 %
Hu*	19,0 %
Su*	10,7 %
Mi*	10,5 - 16,0%
Rd*	23,5 %

3.2. Steigerung der Lyse der Leukämie-Blasten

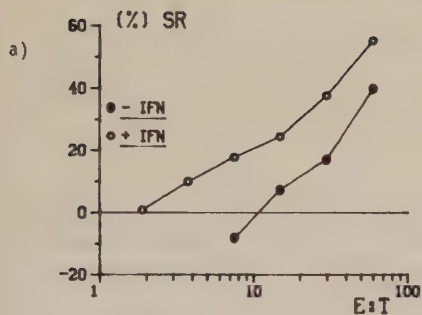
3.2.1. Gesteigerte Lyse durch Interferon

Interferon steigert die spontane zytotoxische Aktivität humaner peripherer Lymphozyten gegen NK-suszeptible Zelllinien (60, 135, 137, 159, 185, 187, 189), einige autologe (2, 134) und allogene Tumoren (96, 98, 190). Auch die geringe zytolytische Aktivität gegen frische allogene Leukämiezellen konnte durch humanes Interferon gesteigert bzw. induziert werden (12, 119, 210).

Auch in unseren Händen erwies sich die lytische Aktivität der PBM gegen frische AL-Blasten als durch Interferon steigbar. PBM wurden für 1-2 h mit oder ohne β -Interferonhaltigem Medium inkubiert (2.2.5.) und ihre Aktivität gegen die Leukämiezellen getestet. Abb. 3.2. zeigt den Vergleich der Lysen der AL-Blasten Vg* und Ri durch IFN-aktivierte (= +IFN) PBM und durch nicht aktivierte (= -IFN) PBM in drei Experimenten (s. S. 35).

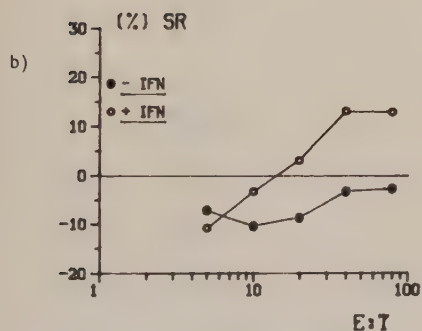
In den drei gezeigten Kurvenpaaren ist eine deutliche Steigerung der Lyse durch Vorinkubation der Effektor-Zellen mit IFN erkennbar. In Experiment 2 z.B. steigt die spezifische Chrom-Freisetzung aus der Target-Zelle Vg* durch Hu-PBM bei einem E:T von 15:1 von 7,4% auf 24,5%. Die gleiche Anzahl aktivierter Effektor-Zellen setzt aus einer festen Anzahl Target-Zellen mehr Chrom frei.

Experiment 5 zeigt deutlich erhöhte Lyse von z.B. -3,3% bei E:T = 40:1 mit -IFN-PBM auf 13,0% mit IFN-aktivierten Zellen. Die nicht aktivierten PBM des Spenders Er sind gegen die Vg*-Zellen so wenig aktiv, daß der von ihnen ausgeübte Schutzeffekt überwiegt (negative Lyse). Die IFN-behandelten Zellen zeigen dagegen einen deutlichen Anstieg der Lyse in den positiven Bereich.

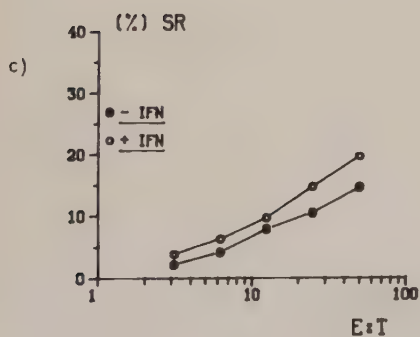


Exp. 2

Abb. 3.2.: Steigerung der Lyse von LBC durch Aktivierung der Effektorzellen mit Fibroblasten-Interferon. PBM der Spender HU (Exp.2), Er (Exp.5) und Ma (Exp.4) wurden für ein bis zwei Stunden mit Interferon, 500 U/ml (+IFN), oder ohne Interferon (-IFN) inkubiert. Die +IFN und die -IFN-PBM wurden jeweils simultan als Effektorzellen gegen die Leukämiezellen Vg^M (Exp. 2 und 5) bzw. Ri (Exp.4) im CRA getestet.



Exp. 5



Exp. 4

In Experiment 4 zeigt sich nur ein geringer Anstieg der lytischen Aktivität der Effektor-Zellen gegen die Target-Zelle Ri. Von 14,6% bei E:T = 50:1 steigt SR auf 19,6% nach Behandlung der Ma-Effektor-Zellen mit β -Interferon.

Insgesamt zeigte die Vorbehandlung der Effektor-Zellen mit hochgereinigtem humanen β -Interferon eine deutliche Auswirkung auf deren lytische Kapazität. Tabelle 3.2. stellt die Auswirkungen der Effektor-Zell-Aktivierung auf die Lyse von AL-Blasten zusammen.

Tabelle 3.2.: Effekt der Aktivierung der Effektorzellen mit Interferon (IFN) auf die Lyse von Leukämiezellen im CRA

Lyse (SR) durch	5%	Target (Diagnose) ^c							
		Vg (AUL)	Sc (AML)	Ri (CML)	St (ALL)	Hu (AMML)	Mi (AML)	Su (CML)	Rd (AML)
1) -IFN - PBM		1/ 6 ^a	2/2	1/2					
2) +IFN - PBM		10/11 ^a	2/4	3/3	0/2	1/2	0/4	1/1	0/2
3) Steigerung der Lyse durch IFN		4/ 4 ^b	2/2	1/1					

^a Zahl der Spender, deren PBM die Targetzelle nach Inkubation ohne IFN (-IFN, 1) bzw. nach Aktivierung mit IFN (+IFN, 2) zu mehr als 5% SR spezifisch lysieren pro (/) Zahl der getesteten Spender.

^b Zahl der Tests, in denen die mit IFN aktivierten Effektorzellen eine um mindestens 5% SR höhere Lyse der Targetzellen bewirkten als die nicht aktivierten (-IFN) PBM desselben Spenders/Zahl der Tests, in denen -IFN-PBM und +IFN-PBM desselben Spenders gegen das unbehandelte Target getestet wurden.

^c AUL = akute undifferenzierte Leukämie, AML = akute myeloische Leukämie, CML = chronisch myeloische Leukämie in Blastenkrise, ALL = akute lymphatische Leukämie, AMML = akute myelo-monozytäre Leukämie.

Die AML-Blasten Sc z.B. wurden in beiden von zwei Tests mit je einem Spender von den nicht-IFN-aktivierten PBM lysiert (Zeile 1). In beiden Experimenten wurden auch mit β -Interferon aktivierte Effektor-Zellen getestet, deren lytische Aktivität in beiden Experimenten höher lag, als die der nicht-aktivierten PBM (Zeile 3). Von insgesamt vier Versuchen, in denen IFN-aktivierte PBM gegen unbehandelte Sc-Zellen getestet wurden, verursachten die PBM von zwei Spendern mehr als 5% spezifische Lyse (Zeile 2). (Vgl. auch Tab. 3.6. Spalten 5 und 7).

3.2.2. Steigerung der Lyse von AL-Blasten durch Vorbehandlung der Blasten mit Actinomycin D

In einer Reihe von Studien zum NK-Mechanismus zeigte sich eine gute Korrelation zwischen der Lysierbarkeit der Target-Zellen und der Fähigkeit dieser Zellen, die Lyse von Standardtargets im cold-target-inhibition-assay (CTI, siehe 2.2.7. und 2.2.6.) zu hemmen bzw. mit Effektor-Zellen Konjugate zu bilden (93, 137, 152). Es fanden sich jedoch auch Zellen, die zwar im NK-CTI inhibieren, aber durch NK-Zellen schlecht lysierbar sind (17, 65, 137, 164). Dies deutet darauf hin, daß es Zellen gibt, die zwar von natürlich-zytotoxischen Zellen erkannt und gebunden werden, aber aufgrund unbekannter Ursachen nicht lysiert werden. Schlager und Ohanion zeigten, daß Tumor-Zelllinien mit Inhibitoren der DNS, RNS und/oder Proteinsynthese gegen die Immunlyse durch Antikörper und Komplement (160, 161, 162, 163) und durch allogene zytotoxische T-Lymphozyten (160) sensibilisiert werden können. Kunkel und Welsh (100) und Collins et al. (27) beobachteten im Maus-NK-System eine gesteigerte Lyse von Zelllinien durch NK-Zellen nach Behandlung der Zelllinien mit Actinomycin D oder Cycloheximid. Auch im menschlichen in-vitro-Tumor-System konnte die spon-

tane Zytotoxizität gegen eine Blasenkarzinom-Zelllinie mit Cycloheximid, Puromycin und Emetin gesteigert werden (74). Daher versuchten wir durch Vorbehandlung der Leukämie-Zellen mit Actinomycin D die Empfindlichkeit frisch isolierter bzw. in flüssigem Stickstoff gelagerter Leukämie-Blasen gegen den zytotoxischen Angriff allogener nicht-immuner PBM zu erhöhen.

3.2.2.1. Lyse durch PBM

Abb. 3.3. vergleicht in drei repräsentativen Experimenten die Lyse von Vg*-Leukämie-Zellen mit oder ohne Vorinkubation mit Actinomycin D (-Act D bzw. + Act D) durch drei verschiedene Spender-PBM (ohne Aktivierung der PBM mit IFN) (s. S.40). In Experiment 5 (Abb.3.3a) steigt die spezifische Chrom-Freisetzung bei E:T = 40:1 von -3,3% auf +17,1%. Die Actinomycin D-Konzentration bei der Vorbehandlung betrug 0,2 µg/ml.

In Experiment 6 (Abb. 3.3b) bleibt die Lyse der Act D-behandelten Target-Zellen im negativen Bereich, doch liegt sie deutlich höher als die der nicht vorbehandelten Zellen, so z.B. bei E:T = 25:1 bei -6,1% (+Act D) statt bei -16,9% (-Act D). Durch die Act D-Vorbehandlung ist hier scheinbar die Lysierbarkeit der Target-Zellen so gestiegen, daß die Differenz zwischen dem Schutzeffekt, der zu einer "negativen Lyse" führt, und der spezifischen Chrom-Freisetzung zunimmt, der SR also weniger negativ wird. Dieser Schluß wäre berechtigt, wenn es sich um dieselbe Target-Zelle und zwei verschiedene Effektor-Zell-Populationen wie z.B. mit und ohne IFN-Aktivierung handeln würde. Bei genauer Analyse unter Berücksichtigung des niedrigeren Spontanreleases S der Act D-behandelten Target-Zellen erscheint es aber möglich, daß der Unterschied in den Lysen der +Act D und -Act D-Vg*-Zellen in diesem Experiment im wesentlichen auf eine Senkung der spontanen Chrom-Freisetzung zurückzuführen

Abb. 3.3.

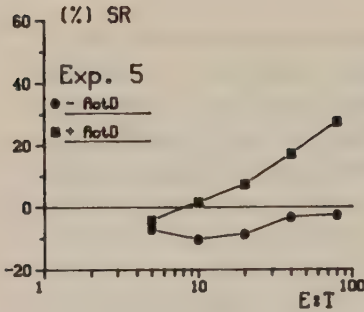


Abb. 3.3.a

Abb. 3.4.

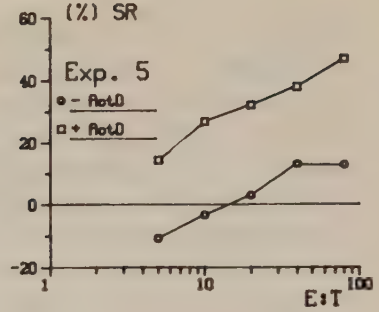


Abb. 3.4.a

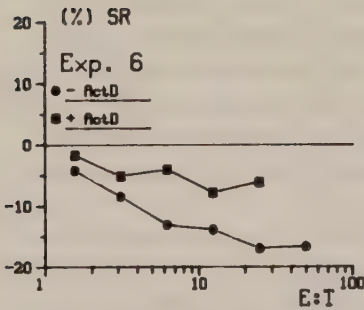


Abb. 3.3.b

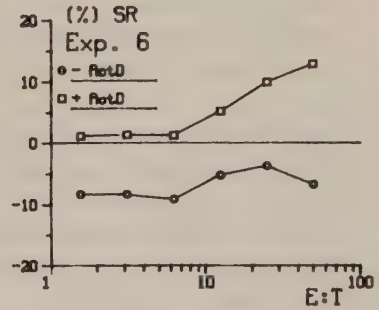


Abb. 3.4.b

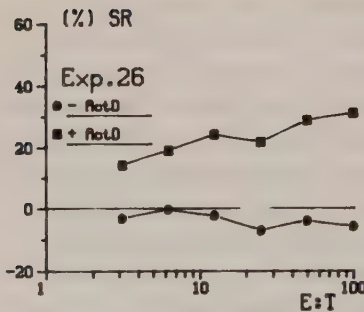


Abb. 3.3.c

Abb. 3.3. und Abb. 3.4. :

Steigerung der Lyse von Vg^* -Blasten durch Vorinkubation mit Actinomycin D
 Vg^* -Blasten wurden für 4 h im RPMI/FCS ohne Actinomycin D (-ActD) oder mit Actinomycin D, 0,2 $\mu g/ml$ in Exp. 5 und 6 und 1,0 $\mu g/ml$ in Exp. 26 (+ActD), inkubiert und als Targetzellen im CRA eingesetzt.

Abb.3.3.:Lyse durch nicht aktivierte PBM

Abb.3.4.:Lyse durch IFN-aktivierte PBM

ist. Bezieht man die absolut gemessene Chrom-Freisetzung E auf die gesamte Chrom-Aufnahme M der Target-Zellen, so zeigt sich, daß in Experiment 6 bei hohen E:T die unbehandelten und die Act D-behandelten Target-Zellen bei Zugabe gleicher Mengen von nicht-aktiven Effektor-Zellen den gleichen Anteil Chrom ins Medium abgeben (siehe Tab. 3.3a).

Tabelle 3.3. a) und b):

Absolut gemessene Chrom-Freisetzung aus Vg*-Zellen durch Di-Effektorzellen bezogen auf M (E/M [%]) in Experiment 6

		Effektorzellen			
		a)	- IFN-PBM	b)	+ IFN-PBM
E	: T	-Act D ^a	+Act D ^a	-Act D	+Act D
50	: 1	23,0 ^b		29,6	38,4
25	: 1	22,7	24,8	31,6	36,2
12,5	: 1	24,9	23,7	30,6	32,9
6,25	: 1	25,4	26,4	28,0	30,1
3,12	: 1	28,4	26,3	28,5	30,2
1,61	: 1	31,2	27,9	28,4	30,0

^a Behandlung der Targetzellen: Inkubation für 4 h mit (+Act D) oder ohne Act D (-Act D), 0,2 µg/ml.

^b $E/M \times 100$ [%]; zur Definition von E und M siehe 2.2.6.4.

Der Spontanrelease war 34,0% für -Act D-Vg*-Zellen und 29,2% für +Act D-Vg*-Zellen.

Actinomycin D hat in Experiment 6 - wie wenig aktive PBM - offensichtlich einen konservierenden Effekt auf Vg*-Target-Zellen, der allerdings schon bei der Bestimmung von S zu Buche schlägt ($S_{+Act D} < S_{-Act D}$). Dadurch werden die Zellen möglicherweise weniger empfänglich für einen weiteren Schutzeffekt durch PBM.

Auch in den Experimenten 5 und 26 (Abb. 3.3a bzw. c) und in anderen Experimenten wurde durch Act D der Spontanrelease aus den Vg*-Zellen vermindert. Dennoch handelt es sich hier um einen echten Anstieg der spezifischen Chrom-Freisetzung, da in beiden Experimenten auch E/M aus dem +Act D-Vg*-Zellen erhöht ist.

Tabelle 3.3.c:

Absolut gemessene Chrom-Freisetzung aus Vg*-Zellen bezogen auf M (E/M %) durch nicht-aktivierte Er-(Exp.5) und Jo-(Exp. 26) PBM.

Experiment 5 (-IFN)				Experiment 26 (-IFN)			
E	:	T	Target Vg*	E	:	T	Target Vg*
			-Act D ^a +Act D ^a				-Act D +Act D
80	:	1	37,6 ^b 59,1	100	:	1	39,7 57,8
40	:	1	36,7 45,5	50	:	1	40,8 56,5
20	:	1	33,3 38,8	25	:	1	39,0 52,4
10	:	1	32,4 34,9	12,5	:	1	41,7 53,9
5	:	1	34,5 31,0	6,25	:	1	43,0 50,6
				3,12	:	1	41,0 47,7

a und b siehe Tabelle 3.3. a) und b)

Um interpretatorische Schwierigkeiten zu vermeiden, werden im weiteren nur Experimente berücksichtigt, in denen parallel zur spezifischen Chrom-Freisetzung auch die Freisetzung gemessen an der Gesamtaktivität der chromierten Targets zuge-

nommen hat. Tabelle 3.4. faßt die Wirkung der Vorbehandlung der Leukämie-Zellen mit Actinomycin D auf deren Lyse durch nicht mit IFN aktivierte PBM zusammen. In insgesamt sieben von zehn Effektor-Leukämie-Kombinationen ließ sich durch Act D-Behandlung eine gesteigerte Lyse der Targets erzielen. In den Experimenten, in denen sich die Lyse durch Act D nicht steigern ließ, betrug SR ohne Behandlung mit Actinomycin D weniger als 5%.

Tabelle 3.4.:

Effekt von Actinomycin D auf die Lysierbarkeit von Leukämie-Zellen durch nicht aktivierte PBM (-IFN - PBM)

Lyse (SR) >5% durch -IFN-PBM von	Target (Diagnose) ^c		
	Vg (AUL)	Sc (AML)	Ri (CML)
1) - Act D Targets ^d	1/6 ^a	1/2	1/2
2) + Act D	5/6 ^a	1/2	1/2
3) Steigerung der Lysier- barkeit durch Act D	5/6 ^b	1/2	1/2

^a Zahl der Tests, in denen Leukämie-Zellen nach 4-stündiger Inkubation mit (+Act D) oder ohne Actinomycin D (-Act D) durch nicht aktivierte allogene PBM lysiert wurden/Zahl der durchgeführten Tests.

^b Zahl der Tests, in denen die Lysierbarkeit der mit Act D inkubierten Targetzellen um mindestens 5% SR größer war, als die der -Act D Targetzellen/Zahl der Tests, in denen die Lysierbarkeit von +Act D- und -Act D-Leukämie-Zellen durch nicht aktivierte PBM verglichen wurde.

^c siehe Tabelle 3.2., die nicht aufgeführten Leukämien wurden nur mit aktivierten Effektorzellen getestet.

3.2.2.2. Lyse durch IFN-aktivierte PBM

Da sich die lytische Kapazität der Effektorzellen gegen AL-Blasten steigern läßt, haben wir vorwiegend Interferon-aktivierte Zellen gegen AL-Blasten eingesetzt. Abb. 3.4.(s.S.40) stellt die Lyse mit und ohne Act D vorbehandelter Vg*-Zellen durch β -Interferon-aktivierte PBM in den Experimenten 5 und 6 den entsprechenden Lysen durch nicht IFN-aktivierte PBM im jeweils selben Experiment gegenüber (Abb. 3.3a bzw. b). Sowohl durch Sensibilisierung der Target-Zellen mit Act D (Abb. 3.3.a) als auch durch die Aktivierung der Effektorzellen mit humanem Fibroblasten-Interferon (Abb. 3.4.a) ist die Grenze der Lysierbarkeit der Vg*-Zellen in Experiment 5 noch nicht erreicht. Durch die Kombination von Sensibilisierung der Leukämie-Zellen und Aktivierung der Effektorzellen kann die Lyse der Leukämie-Blasten weiter verbessert werden (Abb. 3.4.a, +Act D). Auch in Experiment 6 (Abb. 3.3.b, 3.4.b) wird die Lyse durch Interferon-aktivierte Di*-Zellen durch Vorbehandlung der Target-Zellen mit Actinomycin D gesteigert: Die absolute Chrom-Freisetzung (E/M) aus +Act D-Vg*-Zellen liegt durchweg und abhängig von der Effektorzellen-Dosis höher als aus den -Act D-Vg*-Zellen (Tab. 3.3.b).

3.2.2.3. Einfluß verschiedener Parameter der Vorinkubation und der Testdauer auf die Lyse der AL-Blasten durch IFN-aktivierte PBM

3.2.2.3.1. Einfluß der Act D-Konzentration

Um die Dosisabhängigkeit der Actinomycin D-Wirkung auf die Leukämie-Blasten zu ermitteln, haben wir in einer Reihe von Experimenten mehrere Konzentrationen von Act D in der Vorinkubation getestet. Die Ergebnisse vier solcher Experimente sind in Abb. 3.5.b dargestellt. In jeder Kurve sind die Werte für den spezifischen Chrom-Release für die getesteten Konzentrationen bei einem für den Gesamtablauf

ActD [$\mu\text{g/ml}$] S [%]

○	0	27,9
▲	0,1	26,4
+	0,2	23,3
□	1,0	28,6
◇	5,0	38,4

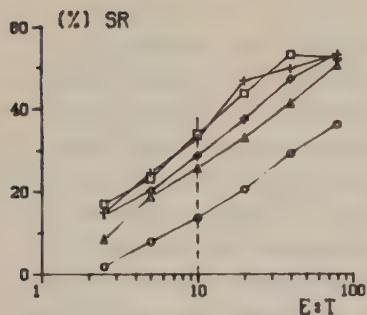


Abb. 3.5.a

□	Vg	, Exp 7	, E:T = 10:1
■	Vg	, Exp 3	, E:T = 12,5:1
○	Sc	, Exp 8	, E:T = 18:1
●	Sc	, Exp 5	, E:T = 37,5:1

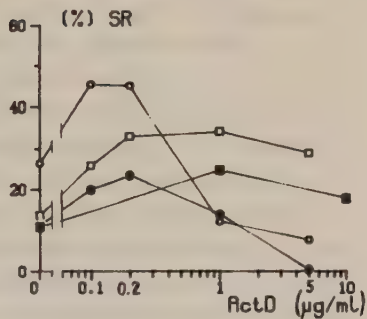


Abb. 3.5.b

Lyse von AL-Blasten nach Vorinkubation mit verschiedenen Konzentrationen von ActD

a) Titrationskurven für verschiedene ActD-Konzentrationen in der Vorinkubation. E:T = 10:1 ist als repräsentatives Effektor-zu-Target-Verhältnis für Abb. 3.5.b ausgewählt.

b) Dosis - Wirkungsbeziehung in vier Experimenten. Die Lyse bei einem repräsentativen E:T ist gegen die wirksame Actinomycin D-Konzentration aufgetragen.

des Experiments charakteristischen, im linearen Bereich der Titrationskurven liegenden Effektor zu Target-Verhältnis aufgetragen. Experiment 7, Abb. 3.5.a, dient zur Illustration. Bei dem hier ausgewählten E:T von 10:1 betrug die Lyse nach Vorinkubation ohne Act D, mit 0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml, 1,0 µg/ml, bzw. 5,0 µg/ml Act D 13,8%, 25,8%, 33,0%, 34,2% bzw. 28,9%. Für das Target Vg* liegen die wirksamsten Konzentrationen also zwischen 0,2 µg/ml und 1,0 µg/ml (Experimente 3 und 7). Für das Sc-Target ist die wirksamste Dosis geringer. Sie liegt zwischen <0,1 µg/ml und 0,2 µg/ml (Experimente 8 und 9). Auch für die Targets St* und Ri* liegen die wirksamsten Act D-Konzentrationen zwischen 0,1 und 1,0 µg/ml.

Bei hohen Dosen von Act D stieg der Spontanrelease S der Target-Zellen, der in Experiment 7 bei niedrigeren Konzentrationen geringer war als ohne Act D, auf Werte über dem Ausgangswert an (siehe Abb. 3.5.a). Dies deutet auf eine beginnende direkte Toxizität des Actinomycin D hin. Auffällig ist der starke Rückgang der Lyse bei höheren Act D-Konzentrationen in Experiment 8. Dieser ist von einem steilen Anstieg des Spontanrelease begleitet, von 10,9% bei 0,2 µg/ml auf 38,5% bei 1,0 µg/ml und 46,7% bei 5,0 µg/ml Act D (S bei 0 µg/ml = 6,0%, bei 0,1 µg/ml S = 7,5%). Vergleicht man die Relation der absolut gemessenen Chrom-Freisetzung zur totalen Chrom-Inkorporation (E/M), so zeigt sich von 0,2 µg/ml Act D auf 1,0 bzw. 5,0 µg/ml kein weiterer Anstieg sondern ein Rückgang.

3.2.2.3.2. Auswirkung der Dauer der Vorinkubation mit Actinomycin D

Den Einfluß der Vorinkubationsdauer mit Act D auf die Lysierbarkeit der Leukämie-Zellen untersuchten wir im Experiment 12 (Abb. 3.6.). Vg*-Zellen wurden auf 1×10^6 /ml eingestellt und in fünf Zellkultur-Flaschen im Brutschrank für 6 h inkubiert. Zu Beginn der Inkubation, nach 2 h, nach 3 h und nach 4 h wurde Actinomycin D in einer Endkonzentration von 0,2 µg/ml zu je einem Ansatz gegeben, so daß die Einwirkungsdauer der Droge 6, 4, 3 und 2 h betrug. Die Markierungszeit (90') wurde zur Inkubationszeit gerechnet, da die Chromierung der Target-Zellen in Anwesenheit von Act D erfolgte (siehe 2.2.6.2.). Eine Probe blieb ohne Act D. Schon 2 h Vorinkubation mit Act D bewirkten eine gesteigerte Lyse, die mit der Einwirkungsdauer von Act D sukzessive zunahm. In etwa parallel sank der Spontanrelease von 38,9 auf 30,7%. Trotz dieses Zeitverlaufs beschränkten wir die Vorinkubation in den anderen Experimenten aus zeitlich-technischen Gründen auf 4 h.

In Experiment 12 betrug der Anteil der toten Zellen nach dem Chromieren: 5,8% ohne Act D, 6,3% nach 2 h Act D, 8,7% nach 3 h Act D, 8,0% nach 4 h und 4,8% nach 6 h Act D-Behandlung (Abb. 3.6.).

In Vorexperimenten hatten wir die Vg*-Target-Zellen über Nacht 14-16 h mit 1,0 µg/ml bzw. ohne Act D inkubiert. Beim Zählen der vorinkubierten Zellen mit Trypanblau fanden sich meist über 50% tote Zellen sowohl in der mit als auch in der ohne Act D inkubierten Population. Nach Entfernung der toten Zellen durch eine zweite Ficoll-Separation (2.2.2.) zeigten die Act D-behandelten Zellen im CRA einen bis zu 20% niedrigeren Spontanrelease als die ohne Act D vorinkubierten Zellen. Auch aus diesem Grund verzichteten wir auf Über-Nacht-Inkubation.

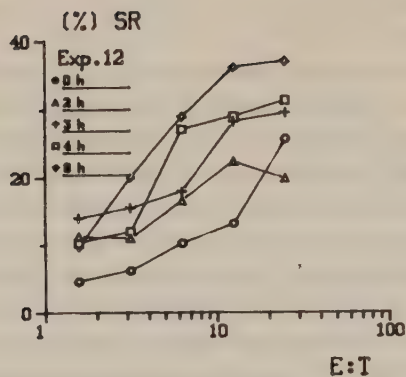


Abb. 3.6. Lyse von Vg*-Zellen nach verschieden langer Einwirkungsdauer von 0,2 $\mu\text{g/ml}$ ActD.

3.2.2.3.3. Kinetik der Lyse der Vg*-Blasten durch +IFN-PBM

Die Kinetik der Lyse der Vg*-Blasten wurde in Experiment 30 untersucht. Fünf gleiche Testplatten wurden angesetzt. Auf jeder Platte wurden Act D-behandelte (0,2 µg/ml) und unbehandelte Vg*-Zellen je mit IFN-aktivierten und mit nicht-aktivierten Fu-Effektorzellen inkubiert. Nach 2 1/4, 4, 6, 7 1/2 und 16 1/2 h wurde je eine Platte geerntet. Abb. 3.7.a zeigt die Lyse der +Act D-Vg*-Zellen durch IFN-PBM nach den angegebenen Testzeiten. Schon nach 2 1/4 h betrug die spezifische Lyse bei E:T = 70:1 27,3% um auf 74,1% nach 7 1/2 h Testansatz zu steigen. Der spezifische Chrom-Release bei E:T = 35:1 ist in Abb. 3.7.b gegen die Zeit des Testansatzes aufgetragen. Es ergibt sich ein nahezu linearer Verlauf mit einer Lyse von 8,7% pro Stunde, wenn man davon ausgeht, daß die Lyse zur Zeit 0 beginnt. Ein Beginn der Lyse nach erst 1-1,5 h ist durch diese Daten allerdings nicht ausgeschlossen. Auch die nicht mit Act D sensibilisierten Vg*-Zellen wurden durch die IFN-aktivierten PBM nach 2 1/4 h bei E:T = 70:1 schon zu 20,1% lysiert. Die nicht aktivierten PBM zeigten in diesem Experiment nur eine geringe, nicht sicher mit der Testlaufzeit zunehmende Lyse der Target-Zellen (nicht dargestellt). Der spontane Chrom-Release S stieg ebenfalls mit der Zeit an:

	2 1/4 h	4 h	6 h	7 1/2 h	16 1/2 h
-Act D	18,6%	27,3%	41,2%	45,9%	70,8%
S					
+Act D	17,8%	24,8%	38,1%	45,8%	76,6%

Wegen dem hohen S nach 16 1/2 h wurden die SR-Werte für diese Zeit in Abb. 3.7. nicht berücksichtigt.

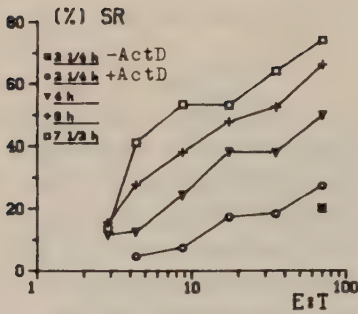


Abb. 3.7.a

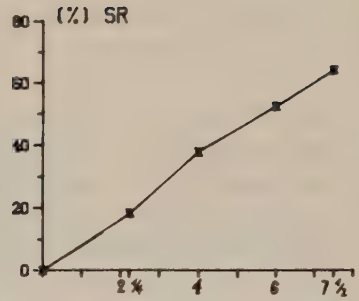


Abb. 3.7.b

Lyse von Vg^{ActD} -LBC nach verschiedener Laufzeit des CRA

- a) Titrationskurven für 2 1/4, 4, 6 und 7 1/2 Stunden Laufzeit des CRA. Die Lyse der unbehandelten Vg^{ActD} -Blasten (-ActD) nach 2 1/4 h bei E:T = 70:1 ist ebenfalls aufgezeigt.

➔ Effektorzellen: Fu + IFN

- b) Die Lyse bei E:T = 35:1 ist gegen die Laufzeit des Testansatzes aufgetragen.

3.2.2.4. Testung des Actinomycin D - Effektes auf die Lysierbarkeit mehrerer Leukämie-Proben

Den Effekt der Vorinkubation mit Act D auf die Lyse der Leukämie-Zellen von acht Patienten mit verschiedenen Diagnosen durch β -Interferon-aktivierte PBM zeigt Tabelle 3.5. Die Act D-Konzentrationen bei der Vorinkubation lagen zwischen 0,1 und 1,0 $\mu\text{g/ml}$, die Vorinkubationsdauer war 4 h. Tabelle 3.6.a gibt weitere Details über die durchgeführten Experimente mit allen getesteten AL-Blasten. Die Lyse der Act D-behandelten AL-Zellen (Spalte 6 und 8) wird mit der Lyse nicht behandelter Blasten (Spalte 5 und 7) anhand repräsentativer Werte für die Chrom-Freisetzung verglichen. Die Auswahl der Werte erfolgte wie für Abb. 3.5. (siehe 3.2.2.3.1.) beschrieben. Als Beispiel ist Experiment 7 (siehe auch Abb. 3.5a) an erster Stelle aufgeführt. Von den Experimenten mit Vg*-Blasten als Target-Zellen sind nur die noch nicht beschriebenen dargestellt.

Tabelle 3.5.:

Effekt von Actinomycin D auf die Lysierbarkeit von Leukämie-Zellen durch aktivierte PBM (+ IFN - PBM)

Lyse (SR) 5% der	Target (Diagnose)							
	Vg (AUL)	Sc (AML)	Ri (CML)	St (ALL)	Hu (AMML)	Mi (AML)	Su (CML)	Rd (AML)
1) -Act D	10/11 ^{a,c}	2/4 ^d	3/3 ^c	0/2 ^c	1/2 ^d	1/1 ^d	0/4	0/2
2) +Act D	11/11 ^{a,c}	2/4 ^d	3/3 ^c	2/2 ^c	1/2 ^d	1/1 ^d	0/4	0/2
Targetzellen								
3) Steigerung der Lysierbarkeit durch Act D	11/11 ^{b,c}	1/4 ^d	3/3 ^c	2/2 ^c	0/2 ^d	0/1 ^d	0/4	0/2

- ^a Zahl der Spender, deren IFN-aktivierte PBM die -Act D- (1) bzw. +Act D Leukämie-Targetzellen (2) lysieren/Zahl der getesteten aktivierten Spender-PBM.
- ^b Zahl Effektor-Leukämie-Kombinationen, in denen die Lysierbarkeit der mit Act D inkubierten Leukämie-Zellen um mindestens 5% SR größer als die der -Act D Leukämie-Zellen/Zahl der Kombinationen, bei denen die Lysierbarkeit von -Act D und +Act D -Leukämie-Zellen durch IFN-aktivierte PBM verglichen wurde.
- ^c In allen Fällen, in denen die Targetzellen zu mehr als 5% SR lysiert wurden, lies sich die Lyse durch Actinomycin D steigern.
- ^d In je einem Experiment trotz Lyse über 5% SR keine Steigerung der Lyse über Δ SR = 5% durch Actinomycin D.

Tabelle 3.6.:

Lyse von Leukämie-Zellen (Tab. 3.6.a), allogenen PBM (Tab. 3.6.b), PHA-Blasten (Tab. 3.6.c) und Zelllinien im CRA (Tab. 3.6.d)

				Spezifische Lyse durch PBM					
Tar- get	Exp.	Effekt.	E:T	-IFN		+IFN		Act D µg/ml	Δ S
				-Act D	+Act D	-Act D	+Act D		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
a) LBC									
Vg*	7	Ro*	10:1			13,8 [±] 1,3	33,0 [±] 3,7	0,2	-4,5
	1	Di	25:1	- 2,7 [±] 3,1	6,7 [±] 4,3	2,1 [±] 2,0	19,0 [±] 2,1	1,0	-1,8
	3	Ch	50:1			24,4 [±] 2,5	45,2 [±] 8,9	1,0	±0
	21	Wi	25:1			7,7 [±] 1,2	19,3 [±] 4,3	0,2 ^B	-0,8
	25	Ma*	19:1	-17,5 [±] 2,2	3,6 [±] 2,0			0,2	-4,3
	27	Fu	75:1	- 4,0 [±] 4,0		10,0 [±] 1,6			
	29	Kr	12,5:1			- 6,4 [±] 1,2	32,0 [±] 5,7	1,0 ^B	-1,6
	31	Ro	12,5:1			21,2 [±] 1,5	33,3 [±] 2,8	0,2	-1,7
Ri	4	Ma	50:1	14,6 [±] 0,2	23,3 [±] 1,2	19,6 [±] 1,7	27,8 [±] 2,0	0,2	0,9
Ri*	10	Jo*	40:1			13,0 [±] 0,6	36,0 [±] 5,1	1,0	2,2
	13	Jo*	70:1	3,5 [±] 1,1	3,7 [±] 0,7			1,0	-1,7
	32	Ra	50:1			9,6 [±] 1,2	18,5 [±] 6,2	1,0	15,1
Sc	8	Fu	18:1			26,4 [±] 2,7	45,5 [±] 2,5	0,1	1,5
Sc*	9	Fu*	37,5:1	7,5 [±] 1,8	12,6 [±] 1,6	11,4 [±] 1,1	20,0 [±] 1,6	0,1	-0,1
	11	Ro*	60:1	5,2 [±] 1,1	3,8 [±] 0,4	8,9 [±] 1,4	12,1 [±] 1,8	0,2	-0,7
	17	Er*	50:1			0,7 [±] 1,7	-1,9 [±] 3,1	0,2	7,1
		Jo*	43:1			3,5 [±] 1,4	4,7 [±] 1,2	0,2	7,1
St*	24	Ma	25:1			-12,3 [±] 1,0	15,0 [±] 2,3	0,2	-3,0
		Wa	30:1			- 7,7 [±] 1,0	21,0 [±] 2,2	0,2	-3,0
Hu*	23	Zi	40:1			12,7 [±] 7,6	15,5 [±] 2,1	0,2	-2,2
		Jo*	25:1			- 2,2 [±] 1,1	2,5 [±] 1,2	0,2	-2,2
Mi*	19	Jo*	25:1			- 0,9 [±] 1,2	-4,3 [±] 0,3	0,2	4,8
		Me*	35:1			- 0,5 [±] 1,4	-2,5 [±] 0,3	0,2	4,8
	22	Fl	120:1			3,9 [±] 0,3	2,3 [±] 0,5	0,2	4,6
		Lö*	80:1			- 1,3 [±] 0,2	-4,0 [±] 1,0	0,2	4,6
Rd*	20	Jo*	30:1			-10,2 [±] 0,1	-10,5 [±] 3,0	0,2	3,8
		Me*	40:1			- 7,1 [±] 2,4	-11,7 [±] 1,4	0,2	3,8
Su*	16	Hb	40:1		10,6 [±] 2,1	20,3 [±] 1,6	18,5 [±] 2,5	0,5 ^B	-1,8

Tabelle 3.6.b-d

				Spezifische Lyse durch PBM					
Tar- get	Exp.	Effekt.	E:T	-IFN		+IFN		Act D µg/ml	Δ S
				-Act D	+Act D	-Act D	+Act D		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
b) <u>PBM</u>									
Di*	K 1	Jo*	60:1			-2,9 [±] 0,9	1,1 [±] 1,0	0,2	2,5
		Me*	50:1			-2,5 [±] 1,9	-0,7 [±] 0,5	0,2	2,5
Er*	K 2	Jo*	60:1			2,2 [±] 0,8	0,5 [±] 0,4	0,2	2,8
		Wa*	60:1			0,2 [±] 1,9	0,5 [±] 1,6	0,2	2,8
Jo*	K 3	Ha	50:1	0,4 [±] 1,0	-1,9 [±] 2,0	1,2 [±] 1,3	-0,1 [±] 3,0	0,2	3,2
c) <u>PHA-Blasten</u>									
Os*	K 4	Jo*	50:1			-0,2 [±] 2,7	-0,5 [±] 1,5	0,2	-0,1
		Me*	50:1			-2,7 [±] 0,7	-3,4 [±] 1,6	0,2	-0,1
Mn	K 5	Os*	50:1			-2,1 [±] 2,5	1,5 [±] 0,8	1,0	
		Sa*	40:1			-1,1 [±] 0,9	1,8 [±] 2,0	1,0	
d) <u>Zelllinien</u>									
K562	K 6	Mr*	25:1	29,6 [±] 0,9	13,8 [±] 0,8	45,4 [±] 2,6	30,4 [±] 1,0	0,2	-0,7
		Ss*	25:1	22,6 [±] 3,2	15,2 [±] 1,5	35,4 [±] 6,2	29,3 [±] 0,1	0,2	-0,7
	K 7	Ss	35:1			49,6 [±] 1,4	34,8 [±] 4,7	1,0	0,5
Molt 4	K 8	Ss*	40:1			47,8 [±] 3,2	29,2 [±] 1,0	0,2	15,2
		Zi*	40:1			58,0 [±] 3,0	35,0 [±] 3,7	0,2	15,2

Die Lyse ist als SR bei einem repräsentativen E:T (Spalte 4) wiedergegeben. Die Lyse durch IFN aktivierte PBM (Spalten 7 und 8) wird mit der Lyse durch nicht aktivierte PBM (Spalten 5 und 6) verglichen. Spalten 5 und 6, bzw. 7 und 8 stellen die Lyse von Leukämie-Zellen, die mit oder ohne Act D in der angegebenen Konzentration (Spalte 9) für 3 1/2 bis 4 h inkubiert worden sind, gegenüber. Die durch Act D verursachte Veränderung der spontanen Chrom-Freisetzung ist in Spalte 10 wiedergegeben:

$$\Delta S = S_{+Act D} - S_{-Act D}$$

Bei vier von acht Leukämien konnte die Lysierbarkeit der Leukämie-Blasten durch +IFN-PBM durch Actinomycin D gesteigert werden. Je ein weiteres Experiment mit den Target-Zellen Ri*, Sc, St* und Vg* zeigt Abb. 3.8. Das Vg*-Target lysierten zehn von elf Effektoren ohne Act D-Vorbehandlung, dagegen konnte es nach Vorinkubation mit Act D von allen elf getesteten +IFN-PBM über 5% SR lysiert werden. In allen Fällen war eine Steigerung der spezifischen Lyse möglich. Beim jeweils höchsten getesteten E:T lag die Lyse der Act D-behandelten Vg*-Zellen in sieben Fällen über 20% SR höher als die der -Act D-Vg*-Zellen (z.B. Exp. 15, Abb. 3.8.), in drei Fällen 10% und in einem Experiment 5,8%.

Die Lyse der Sc-Leukämie-Zellen ließ sich in zwei Experimenten mit demselben Effektor steigern. In Experiment 8 wurden sowohl Effektor- als auch Target-Zellen direkt nach der Separation verwendet. Die Lyse stieg von 37,5% auf 55,7% bei E:T = 70:1. In Experiment 9 wurden Sc-Zellen und Fu-PBM nach Lagerung in N₂ getestet; die Lyse stieg von 14,5% auf 21,8% bei E:T = 75:1. Zwei weitere Spender-PBM zeigten keine Lyse über 5% (Experiment 17), in einem Experiment stieg die Lyse von 8,9 auf 12,1%, was wir nicht als Steigerung werteten (Δ SR < 5%).

Ri-Leukämie-Blasten wurden von drei Spendern lysiert; die SR-Werte ließen sich durch Act D um 17,0, 15,3 und 8,2% steigern (Abb. 3.8.b und Tab. 3.6.a, Exp. 32, 10,4 resp.).

Keine der beiden Spender-PBM lysierten unbehandelte St*-Blasten; doch beide zeigten eine deutliche zytolytische Aktivität gegen +Act D-St*-Zellen (Abb. 3.8.d, Tab. 3.6.a, Exp. 24).

Die Leukämien Hu* und Su* ließen sich von je einem Spender lysieren, doch konnte diese Lyse durch Actinomycin D in beiden Fällen nicht gesteigert werden. Gegen die Leukämien Mi* und Rd* fanden wir bei vier bzw. zwei IFN-aktivierten

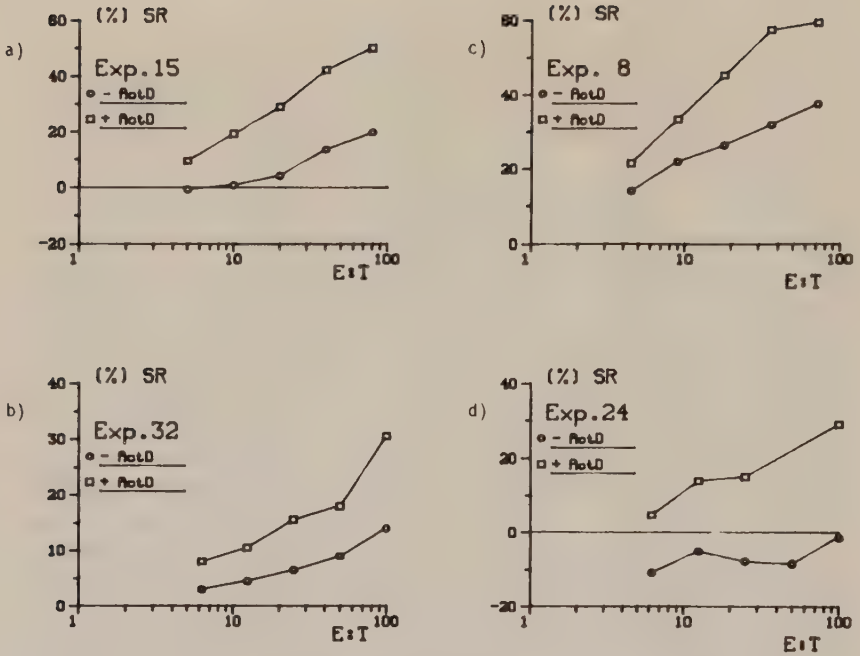


Abb. 3.8.: Effekt der Vorinkubation mit ActD auf die Lyse der Leukämiezellen von vier Patienten durch allogene IFN-aktivierte PBM im Standard-CRA.

Targetzellen a) Vg⁺; b) Ri⁺; c) Sc; d) St⁺

Spender-PBM trotz Vorbehandlung mit Act D keine zytotoxische Aktivität.

In Tab. 3.6. ist in Spalte 9 die für die dargestellte Sensibilisierung der Target-Zellen verantwortliche Act D-Konzentration angegeben. Dabei wurde die Konzentration von mehreren getesteten Konzentrationen gewählt, bei der sich bei möglichst wenig verändertem Spontanrelease ein Unterschied in den Lysen der behandelten und nicht behandelten Target-Zellen deutlich zeigte. Die Spannweite der S-Werte für die unbehandelten Leukämien wurde schon in Tab. 3.1. aufgezeigt. In Spalte 10 sind die Veränderungen von S durch die Act D-Behandlung angegeben ($\Delta S = S_{+Act D}[\%] - S_{-Act D}[\%]$, wobei $S[\%] = S/M \times 100$). Bei den Leukämien Vg, Ri, Sc und St nahm der Spontanrelease durch die Act D-Behandlung eher ab, Anstiege blieben unter 3% mit Ausnahme der Experimente 2 (siehe Abb. 3.2., $\Delta S = 3,5\%$, SR = 55,5% ohne Act D und 83,2% mit Act D-Vorbehandlung bei E:T = 60:1), 32 und 33 (siehe 3.5.). Bei den Leukämien, deren Lyse nicht gesteigert werden konnte, war S der +Act D-Zellen erhöht.

3.2.2.5. Einfluß der Lagerung der Zellen in N₂

Bei zwei Leukämie-Zellen konnten wir die Möglichkeit der gesteigerten Lyse durch Act D sowohl an frisch separierten Blasten, als auch nach deren Lagerung in flüssigem Stickstoff testen. Sowohl die Lyse der frisch separierten Ri-Zellen (Ri, Exp. 4), als auch die Lyse der N₂-gelagerten Ri-Zellen (Ri*, Exp. 10 und 32) konnte durch Act D gesteigert werden (Tab. 3.6.a). Dasselbe gilt für die Zelle Sc (Sc, Exp. 8, Tab. 3.6.a, Sc* Exp. 9). Das spricht dafür, daß eine Sensibilisierung für die spontane oder IFN-aktivierte zytotoxische Aktivität peripherer mononukleärer Zellen nicht auf einen Artefakt durch das Einfrier-, Lagerungs- und/oder Auftauverfahren bedingt ist. Eine Beeinflussung des Testablaufs durch das Cryopräservationsverfahren ist aber sicher gegeben (vgl. Sc, Exp. 8 und 9).

Die Lyse der Targetzellen und die Steigerung der Lyse durch Act D fällt eher niedriger aus. Ebenso zeigt sich ein Anstieg der spontanen Chrom-Freisetzung S (siehe Tab. 3.1.), wie auch von anderen berichtet (24).

Verschiedene Gruppen berichteten über eine verminderte NK-Aktivität peripherer Lymphozyten nach deren Lagerung in flüssigem Stickstoff (82, 126, 170). Gerade im Fall der NK-Funktion sei die Wiedergewinnung der Aktivität sehr variabel (170). Unsere Daten (Tab. 3.6.a und einige der gezeigten Abb.) zeigen, daß nach dem Einfrieren und Auftauen mit dem verwendeten Programm (2.2.3.1. und 2.2.3.2.) eine meßbare Aktivität gegen NK-Standard-Targets (Tab. 3.6.a) und auch gegen akute Leukämien erhalten bleiben kann (z.B. Exp. 7 und 31, Tab. 3.6.a). Ebenso bleibt die Aktivierbarkeit der Effektor-Zellen durch IFN demonstrierbar, wie in Experiment 6 (Abb. 3.3.b bzw. 3.4.b), Experiment 25 (Tab. 3.6.a) und dem in Abb. 3.9. gezeigten Experiment mit K 562 als Target-Zelle.

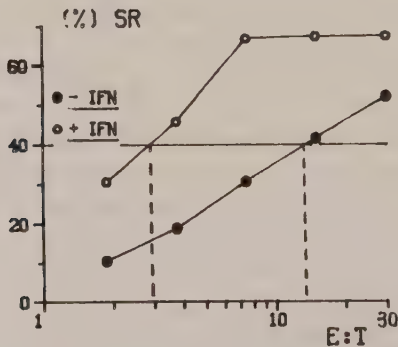


Abb. 3.9.: Lyse von K562 Zellkulturzellen durch cryo-präservierte PBM nach Vorinkubation der Effektorzellen mit und ohne IFN.

3.3. Kontrollexperimente

Um einen unspezifischen Effekt des Act D auf die Sensibilität aller Zellen gegen NK-Zellen auszuschließen, haben wir eine Reihe von Kontrollexperimenten unternommen. Zunächst scheint ein unspezifischer Effekt schon dadurch ausgeschlossen, daß sich die Lyse von vier von acht Leukämie-Zellen nicht durch Act D steigern ließ. In Experiment 16 (Target Su*) ließ sich die Lyse der Act D behandelten Zellen zwar durch IFN erhöhen, sie lag aber dann nicht höher als die der -Act D-Blasten durch +IFN-PBM.

3.3.1. PBM als Target-Zellen

In fünf Effektor-Target-Kombinationen testeten wir drei PBM* normaler Spender als Target-Zellen im Chrom-Release-Test (Tab. 3.6.b). In keinem der Experimente K 1 - K 3 zeigte sich eine gesteigerte bzw. überhaupt meßbare Lyse bei Act D-Dosen zwischen 0,2 und 5,0 µg/ml Act D in der Vorinkubation von 4 h. Die Effektor-Zellen waren jeweils mit IFN aktiviert. Um sicher zu sein, daß die Effektor-Zellen ihre spontane zytotoxische Aktivität durch die Cryopräservierung oder experimentelle Fehler nicht völlig verloren hatten, testeten wir in den Experimenten K 1 und K 2 parallel zur Lyse der PBM die NK-Aktivität der Effektor-Zellen gegen das Standard-Target K 562. Alle Spender (Jo*, Me* und Wa*) zeigten deutliche Aktivität gegen die Zelllinie K 562. Jo* und Me* lysierten K 562 zu über 70% im Experiment K 1, Wa* zu über 60% in Exp. K 2.

Nach Pross et al. (142) spiegelt die maximal mögliche Lyse einer NK-empfindlichen Target-Zelle in einem einheitlichen Testsystem eher die Eigenschaften der Target-Zellen wider, als die Aktivität der Effektor-Zellen. Die unterschiedliche

Aktivität verschiedener Effektor-Zellen gegen dieselbe Target-Zell-Population zeigt sich besser in einer Parallelverschiebung der Titrationskurve entlang der E:T-Achse, also der Zahl der Effektor-Zellen, die eine bestimmte spezifische Chrom-Freisetzung aus den Target-Zellen verursachen. Quantifiziert wird dieser Unterschied in lytischen Einheiten (LU) bzw. $\text{LU}/10^6$ Zellen. Eine lytische Einheit ist die Zahl von Effektor-Zellen, die eine festgelegte spezifische Chrom-Freisetzung aus einer festen Zahl von Target-Zellen bewirkt.

In Abb. 3.9. entsprächen z.B. 1 LU_{40} $1,4 \times 10^5$ -IFN-Effektor-Zellen, da aus 10^4 Target-Zellen (pro Well) durch 14×10^4 Effektor-Zellen (E:T = 14:1) 40% Chrom spezifisch freigesetzt werden. Dem entsprächen $7,1 \text{ LU}_{40}/10^6$ Zellen. Die +IFN-We*-PBM haben demgegenüber eine lytische Aktivität von $33 \text{ LU}_{40}/10^6$, da eine spezifische Lyse von 40% schon bei einem E:T von 3:1 erreicht wird.

Gemessen in $\text{LU}_{40}/10^6$ PBM hatten Jo*-Zellen eine Aktivität gegen K 562 von 19,2 bzw. 8,3 in Experiment K 1 bzw. K 2, Me* 12,2 in Experiment K 1 und Wa* 5,2 in Experiment K 2. Bei 20 NK-Experimenten mit +IFN-PBM* nach Lagerung in N_2 betrug die mittlere Aktivität gegen K 562 $12,1 \pm 8,0 \text{ LU}_{40}/10^6$ PBM (8,0 = Standardabweichung). Bei 7 +IFN-PBM, die direkt nach der Separation eingesetzt wurden, entsprechend $19,0 \pm 9,1 \text{ LU}_{40}/10^6$. Insbesondere Jo* und Me* PBM in Experiment K 1 zeigten also durchaus eine gute Aktivität, sodaß ein Ausbleiben der Lyse von mit Act D behandeltem PBM nicht auf ein Fehlen jeglicher NK-Aktivität zurückgeführt werden kann. Auch für die Experimente mit den Leukämien Hu*, Mi*, Rd* und Su*, deren Lyse durch Act D nicht gesteigert werden konnte, konnte bei der parallel bestimmten NK-Aktivität gegen K 562 eine lytische Aktivität von je mindestens $5 \text{ LU}_{40}/10^6$ +IFN-PBM nachgewiesen werden.

3.3.2. PHA-Blasten als Target-Zellen

In zwei Experimenten (Exp. K 4 und K 5, Tab. 3.6.c) haben wir PBM von normalen Spendern mit PHA inkubiert und die resultierenden T-Zell-Blasten (= PHA-Blasten) als Targets im Standard-Chrom-Freisetzungstest eingesetzt. Die Vorinkubation mit Act D machte die Zellen nicht gegen Interferon-aktivierte PBM empfindlich, die PHA-Blasten wurden nicht lysiert.

3.3.3. NK-sensible Zelllinien als Targets

Um zu prüfen, ob auch die Lyse hoch NK-suszeptibler Tumor-Zelllinien durch Actinomycin D gesteigert werden könne, inkubierten wir die Zelllinien K 562 und Molt 4 mit verschiedenen Konzentrationen von Act D und setzten sie in CRA als Target-Zellen ein (Tab. 3.6.d). Im Gegensatz zu den frisch isolierten Leukämie-Zellen Vg, Sc, Ri und St, ließ sich die Lyse dieser Zellen nicht steigern. Im Gegenteil, die Lysierbarkeit dieser Zellen nahm mit zunehmender Act D-Konzentration bei der Vorinkubation ab. Dies gilt sowohl für K 562 als auch für Molt 4. Gleiches wurde von Hudig et al. berichtet (74).

3.4. Untersuchungen zum Mechanismus der Sensibilisierung durch Act D

3.4.1. Autologe Cold-Target-Inhibition

Die Act D induzierte Steigerung der Lyse der AL-Blasten könnte in der ersten Phase der Effektor-Target-Interaktion, im "target binding", wirken. Dies könnte bedingt sein durch vermehrte Expression von Targetstrukturen, günstigere Orientierung oder Konformation der Targetstrukturen in der Zellmembran oder eine Zunahme der von den Effektorzellen erkannten Zellpopulation. Um diese Möglichkeit abzuklären, haben wir mit und ohne Act D vorinkubierte AL-Blasten als Inhibitoren im Cold-Target-Inhibition-Assay (2.2.7) getestet. Als Targets dienten +Act D-, in Exp. 33 auch -Act D-AL-Blasten. Zu einer festen Anzahl chromierter Target-Zellen (5×10^3 oder 1×10^4 /Well) und IFN-aktivierter Effektorzellen wurden verschiedene Mengen unchromierter +Act D- bzw. -Act D-Blasten gegeben. Für Vg*-Blasten zeigte sich kein Unterschied in der Fähigkeit nicht mit Chrom markierter +Act D- und -Act D-Vg*-Zellen, die Lyse der chromierten, mit Actinomycin D behandelten Vg*-Blasten zu hemmen (Exp. 33, Abb. 3.10. und Exp. 18 und 31, Tab. 3.7.).

In Exp. 33 (Abb. 3.10.) beträgt die Lyse der chromierten +Act D-Vg*-Zellen bei E:T = 35:1 63%. Durch Zugabe von unchromierten Vg*-Zellen in einem Inhibitor-zu-Target-Verhältnis (I:T) von 1,5:1 bis 25:1 wird die Lyse durch beide Inhibitor-Populationen (+Act D, -Act D) im gleichen Ausmaß reduziert. Dasselbe gilt für die Lyse der chromierten -Act D-Vg*-Blasten, die ebenfalls durch nicht-chromierte -Act D-Zellen und +Act D-Zellen im gleichen Umfang gehemmt wird.

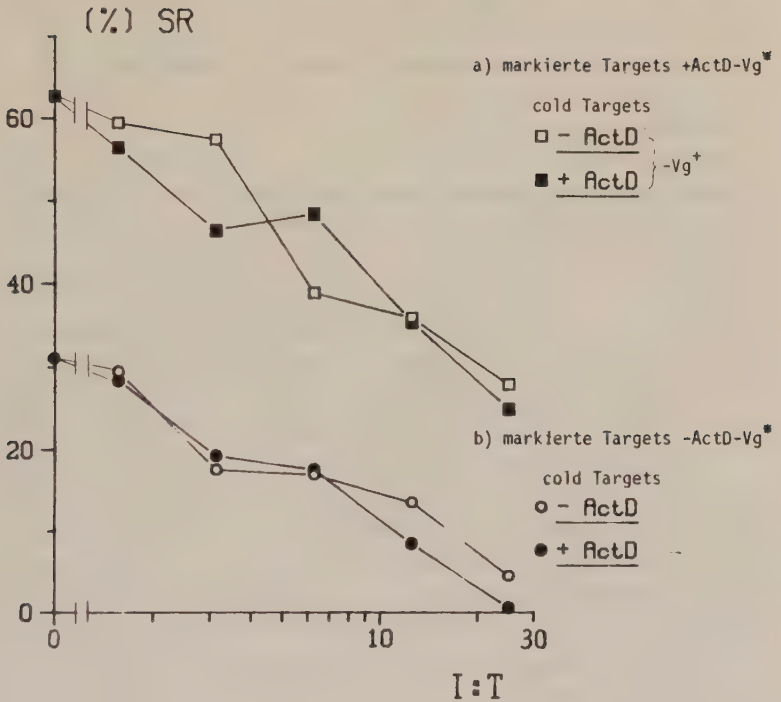


Abb. 3.10.: Cold-Target-Inhibition der Lyse von Vg*-Blasten durch autologe unbehandelte und ActD-behandelte Blasten.

⁵¹Cr-markierte unbehandelte (○, ●) oder ActD-behandelte (□, ■) Vg*-Zellen und IFN-aktivierte PBM wurden im konstanten E:T = 35:1 (Effektorzellen : markierten ActD-behandelten (●, ■) oder unbehandelten (○, □) Vg*-Zellen) vermischt und im CRA getestet.

Gleichartige Ergebnisse ergaben sich bei Experimenten mit Ri- und Sc-Blasten, in denen ebenfalls ohne Act D inkubierte autologe Inhibitorzellen die Lyse so stark herabsetzten wie Ri- bzw. Sc-Zellen, die mit Actinomycin D inkubiert worden waren (Exp. 35 und 36, Tab. 3.7.).

Tabelle 3.7.:

Inhibition der Lyse chrommarkierter Leukämie-Zellen durch unmarkierte autologe mit oder ohne Act D inkubierte Blasten

		Spezifische Lyse nach Zugabe autologer Inhibitorzellen im Inhibitor:Target-Verhältnis ^a				
Exp.	Target ^b	0 : 1 ^c	3,1 : 1	6,3 : 1	12,5 : 1	25 : 1
33	Vg-ActD	31,3	17,6/19,3 ^d	17,0/17,6	13,6/ 8,5	4,5/ 0,6
	Vg+ActD	63,0	59,0/46,5	39,0/48,5	36,0/35,5	28,0/25,0
31	Vg-ActD	31,3				
	Vg+ActD	48,6	40,2/40,6	35,9/36,9	18,8/24,5	19,2/19,2
18	Vg-ActD	3,4				
	Vg+ActD	21,4	12,5/ 9,3	11,7/ 2,2	5,7/ 1,0	0,8/-5,9
35	Sc-ActD	0,9				
	Sc+ActD	6,9	8,7/ 8,2	9,1/ 9,5	7,4/ 7,8	3,9/ 5,4
36	Ri-ActD	18,9				
	Ri+ActD	32,9	13,8/13,4	10,9/ 8,2	5,7/ 5,6	3,5/ 3,4
	Ri-ActD	12,0				
	Ri+ActD	30,0	11,4/ 8,9	8,0/ 8,0	5,2/ 5,2	2,5/ 1,9

^a Zu chrommarkierten LBC und Effektorzellen in konstantem E:T wurden verschiedene Mengen unmarkierter autologer LBC nach deren Inkubation mit oder ohne Act D (+Act D, -Act D) zugegeben

^b markierte Targetzellen

^c SR ohne Inhibitorzellen

^d SR nach Zugabe von -Act D-Inhibitoren/SR nach Zugabe von +Act D-Inhibitoren (autologe LBC)

3.4.2. Spezifität der Lyse der AL-Blasten durch PBM

Die spontane Lyse der AL-Blasten Vg, Sc, Ri und St im 6 h CRA durch frische oder IFN-aktivierte PBM gesunder Spender legt nahe, daß es sich bei der zytotoxisch aktiven Subpopulation der PBM um die NK-Zell-Fraktion handelt. Um diesen Schluß zu verifizieren, führten wir weitere CTI-Experimente mit den NK-Standard-Targets K 562 und Molt 4 durch. Abb. 3.11.a zeigt ein CTI-Experiment mit Act D-behandelten Vg*-Zellen als chromierte Targets (Experiment 31). Als unmarkierte Inhibitoren wurden +Act D-Vg*-Zellen, Molt 4 und die P 815-Maus-Mastozytom-Zelllinie eingesetzt. Bei einem E:T von 50:1 beträgt die Lyse der +Act D-Vg*-Zellen 48,6%, die der -Act D-Vg*-Zellen 31,3%, jeweils in Abwesenheit von Inhibitor-Zellen. Addition von unmarkierten +Act D-Vg*-Zellen bis zu einem I:T von 25:1 vermindert die Lyse der markierten +Act D-Vg*-Blasten auf 20,1%. Molt 4 als Inhibitor reduziert die Chrom-Freisetzung noch stärker. Titrierbar sinkt SR auf bis zu 5,3% bei I:T = 25:1. Demgegenüber wird durch die als nicht NK-sensitiv geltende P 815-Zelllinie die Lyse nur beim höchsten I:T reduziert (32,6% SR). Im selben Experiment wurden chromierte P 815-Zellen durch die Spender-PBM bis zu 13,3% bei E:T = 50:1 lysiert. Auch K 562 erweist sich gegenüber Actinomycin D-behandelten Vg*-Zellen als Inhibitor überlegen (Abb. 3.11.b). Von 53,0% SR ohne kalte Targets titriert die Chrom-Freisetzung durch Zugabe von K 562 auf 3,9%, während kalte +Act D-Vg*-Blasten nur auf 20,2% inhibieren. P 815 zeigt wiederum nur einen geringen unspezifischen inhibitorischen Effekt. In diesem Experiment wurde die Lyse der Vg*-Zellen durch Act D von 38,9 auf 53,0% gesteigert. Entsprechende Resultate ergaben sich bei der Inhibition der Lyse von St*- und Ri*-Blasten mit K 562 oder Molt 4 (Tabelle 3.8.).

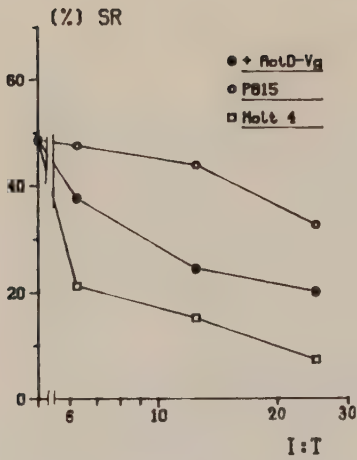


Abb. 3.11.a

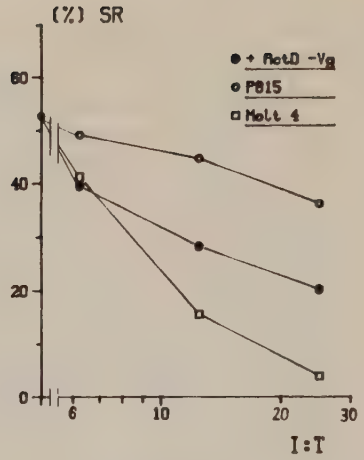


Abb. 3.11.b

Inhibition der Lyse markierter +ActD-Vg[■]-Blasten im CTJ durch unchromierte +ActD-Vg[■], die NK-sensiblen Zelllinien Molt4 (3.11.a) und K562 (3.11.b) und die NK insensitive Zelllinie P815.

Tabelle 3.8.:

Hemmung der Lyse chrommarkierter Leukämie-Zellen durch
Leukämie-Zelllinien

Exp.	Target ^b (+ActD)	Lyse nach Zugabe unmarkierter Inhibitor- zellen der Zelllinien: ^a				
		<u>-^c</u>	<u>P 815</u>	<u>Molt 4</u>	<u>K 562</u>	<u>LBC^d</u>
31	Vg	48,6	32,6	7,3		20,1
34	Vg	53,0	36,1		3,9	20,2
37	St	39,4	24,7	6,4	2,1	3,4
38	Ri	16,4	18,8	10,7		8,7

^a I:T = 25:1

^b chrommarkierte LBC, mit Act D vorinkubiert

^c Lyse der Targetzellen beim verwendeten E:T ohne Inhibitor-
zellen

^d autologe Inhibitorzellen, unmarkiert, mit Act D vor-
inkubiert

4. Diskussion

Die hier vorgestellten Daten zeigen, daß die Lyse frischer menschlicher Leukämie-Zellen durch NK-Zellen durch Vorbehandlung der Leukämie-Zellen mit einem Zytostatikum gesteigert werden kann. Andere Gruppen fanden ähnliche Effekte in Maus- oder Mensch-NK-Systemen, doch verwendeten sie Fibroblasten- oder Blasenkarzinom-Zelllinien als Targetzellen, die über lange Zeit unter Zellkulturbedingungen gehalten worden waren (27, 74, 100). Diese Arbeit (und die Publikationen über diese Ergebnisse 33, 206) demonstrieren zum ersten Mal eine Steigerung der NK-Lyse von frischen, nicht an Kulturbedingungen adaptierten humanen Tumorzellen durch Zytostatikabehandlung. Bevor die vorgestellten Ergebnisse und ihre Implikationen diskutiert werden, wird in 4.1. und 4.2. auf technische Probleme eingegangen.

4.1. Einfluß des biologischen Einfrierverfahrens auf Target- und Effektorzellen

Die ersten hier vorgestellten Experimente wurden mit cryopräservierten Vg*-Zellen durchgeführt. Sie ließen die Möglichkeit offen, daß die Sensibilisierung gegen NK-Zellen durch Actinomycin D ein Artefakt durch das Einfrier- oder Auftautrauma ist. Bei zwei Leukämien hatten wir die Möglichkeit, sie sofort nach der Separation zu testen; also ohne vorheriges Einfrieren und Lagern in N₂ (siehe Tabelle 3.6.a, Exp. 4 und 8). Bei beiden frisch separierten Leukämien Ri und Sc ließ sich die Lyse durch Actinomycin D steigern. Die Sensibilisierbarkeit für die NK-Lyse durch Act D ist also nicht durch die Cryopräservierung bedingt.

Ebenso zeigt besonders Experiment 8 deutlich, daß auch die Lysierbarkeit selbst nicht von einer vorhergegangenen Cryopräservierung abhängig ist.

Übereinstimmend mit anderen (24) fanden wir allerdings einen erhöhten Spontanrelease aus vorher cryopräservierten LBC (Tabelle 3.1.). Der schädliche Effekt der Cryopräservierung wirkt aber so unspezifisch auf verschiedene LBC-Subpopulationen, daß das Ergebnis unserer Tests höchstens quantitativ, nicht qualitativ beeinflußt wird: Aus den Ergebnissen der Experimente 4 und 10 und 8 und 9 ergibt sich kein Hinweis auf eine selektive Anreicherung oder Depletion lysierbarer oder sensitivierbarer Zellen.

Über den Einfluß der Cryopräservierung auf die Effektorzellen im NK-Test gibt es verschiedene Berichte (40, 41, 73, 86, 126, 127, 170), die zwar darin übereinstimmen, daß die NK-Funktion meßbar erhalten bleibt, aber über das Ausmaß der Reduktion der NK-Aktivität unterschiedliche Aussagen machen. Diese soll zwischen 0 und 50% liegen. Strong et al. (170) berichten über eine selektive Schädigung des NK-Lysemechanismus durch die Cryopräservierung: Die ADCC-Funktion von cryopräservierten PBM bleibt reproduzierbar gut erhalten, während die Zurückgewinnung der NK-Funktion aus demselben Zellmaterial starken Schwankungen unterworfen ist. Wir fanden mit eingefrorenen Effektorzellen eine leicht verminderte NK-Aktivität gegen das NK-Standard-Target K 562: In sieben Experimenten mit frisch separierten und mit IFN-aktivierten PBM als Effektorzellen lag die lytische Aktivität gegen K 562 bei $19,0 \pm 9,1 \text{ LU}_{40}/10^6 \text{ PBM}$ (siehe 3.3.1.), hingegen mit cryopräservierten und IFN-aktivierten PBM bei $12,1 \pm 8,0 \text{ LU}_{40}/10^6 \text{ PBM}$ (20 Experimente). Eine Lyse von AL-Blasten, wie sie von anderen beschrieben worden ist (119, 201), konnten wir sowohl mit frisch separierten PBM, als auch mit PBM nachweisen, die im flüssigen Stickstoff gelagert waren (Tabelle 3.6.a). Auch die Akti-

vierbarkeit der Effektorzellen durch IFN bleibt erhalten (siehe 3.2.2.5.).

Obwohl die Verwendung cryopräservierter Effektor- und Targetzellen die Ergebnisse unserer Versuche quantitativ beeinflusst hat, erscheint die Cryopräservierung von Zellmaterial wegen der Arbeitersparnis und - in einem theoretischen Institut, das nicht an eine hämatologische Klinik angeschlossen ist - wegen der logistischen Schwierigkeiten durchaus gerechtfertigt. Eine Verfälschung der Ergebnisse ist eher im Sinne einer Unterschätzung des Act D-Effektes zu erwarten.

4.2. Berechnung von SR und Einfluß der spontanen Chrom-Freisetzung S auf die Ergebnisse

Die Behandlung der sensibilisierbaren Leukämiezellen mit Act D in optimalen Dosen führte in den meisten Experimenten zu einer geringen Verminderung der spontanen Chrom-Freisetzung. Dadurch stellt sich die Frage der Vergleichbarkeit der SR-Werte für die Lyse von Leukämie-Zellen, die mit oder ohne Act D vorinkubiert worden sind. In dieser Studie wurde die spezifische Chrom-Freisetzung nach Formel 1 (siehe 2.2.6.2.) berechnet. Sie setzt die spezifisch freigesetzte Radioaktivität ($E - S$) in Beziehung zur gesamten spezifisch freisetzbaren Aktivität ($M - S$). Von der in Anwesenheit von Effektorzellen freigesetzten ^{51}Cr -Radioaktivität E und der gesamten Chrom-Inkorporation M wurde jeweils die spontane Chrom-Freisetzung S abgezogen, da die spontan zerfallenden Zellen nicht für eine meßbare spezifische Freisetzung zur Verfügung stehen. SR wird dadurch unabhängig von S und die Lyse verschiedener Targetzellpopulationen mit unterschiedlicher Vorbehandlung wird auch bei unterschiedlichem S vergleichbar.

Besonders bei Vg*-LBC war S relativ hoch, was zumindest zum Teil als Folge der Cryopräservierung zu betrachten ist. Dadurch ergibt sich die interpretatorische Schwierigkeit, daß entsprechend dem hohen S in einer relativ großen Fraktion der gesamten Targetzellpopulation Verschiebungen zwischen Subpopulationen stattfinden können, die das Ergebnis des CRA entscheidend beeinflussen könnten ohne offensichtlich zu sein. So könnte Act D z.B. zu einer selektiven Anreicherung oder Depletion lysierbarer Zellen führen, ohne diese selbst gegen NK-Zellen zu sensitivieren. Voraussetzung für den Vergleich der spezifischen Chrom-Freisetzung im CRA aus Targetzellen mit unterschiedlicher Vorbehandlung ist also, daß die lysierbaren und nicht lysierbaren Subpopulationen unabhängig von der Vorbehandlung mit oder ohne Act D gleichermaßen, entsprechend ihrem Anteil an der Gesamtpopulation vom Spontanrelease betroffen sind. Die CTI-Daten mit autologen + oder - Act D-Tumorzellen (siehe 3.4.1.) geben keinen Hinweis auf eine Anreicherung von Zellen, die von NK-Effektorzellen erkannt und lysiert werden, durch die Vorinkubation mit Act D: Die Targetzellen, die mit oder ohne Act D vorinkubiert worden waren, inhibierten die Lyse autologer Tumoren gleich gut. Daraus ist zu vermuten, daß beide Populationen in gleichem Umfang zum Spontanrelease beitragen, da eine spezifische Depletion oder Selektion einer bestimmten Zellsubpopulation durch deren über- oder unterproportionalem Zerfall zustande käme.

In manchen Experimenten wurde die Chrom-Freisetzung durch PBM unter den S-Wert gesenkt, es ergab sich also ein negativer Wert für SR. Dieses Phänomen wurde schon früh beobachtet (62, 67), und als Schutzeffekt durch Produktion von Wachstumsfaktoren oder essentiellen Nährstoffen interpretiert. Durch eine Senkung des Spontanrelease kann besonders bei negativen SR-Werten eine Situation entstehen, in der anhand des SR-Wertes nicht entschieden werden kann,

ob durch Act D die spezifische Chrom-Freisetzung erhöht wird oder ob sich nur rechnerisch ein erhöhter SR-Wert ergibt, weil Act D die behandelten Targetzellen für einen weiteren Schutzeffekt durch PBM weniger empfindlich machte als nicht behandelte Targetzellen, da ihr Spontanrelease schon nahe an einem hypothetischen optimalen S-Wert liegt. Um diese interpretatorischen Schwierigkeiten zu vermeiden, wurden nur solche Ergebnisse als Steigerung der Lysierbarkeit gewertet, bei denen nicht nur die errechnete spezifische Lyse, sondern auch die in Anwesenheit von Effektorzellen gemessene Chrom-Freisetzung in Bezug auf die gesamte Chrom-Inkorporation (E/M, 3.2.2.1.) zugenommen hat.

Bei hohen Act D-Dosen wurde die Lyse der Tumorzellen vermindert, deren Lyse durch geringere Dosen gesteigert werden konnte. Gleichzeitig stieg der Spontanrelease in einigen Experimenten stark an (siehe 3.2.2.3.1.). Dies läßt vermuten, daß bei hohen Act D-Dosen lysierbare bzw. sensitivierte Leukämie-Zellen spontan zerfallen, somit zum Spontanrelease beitragen und nicht für eine spezifische Lyse zur Verfügung stehen. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, daß die gesamte experimentelle Chrom-Freisetzung E/M in z.B. Experiment 9 durch hohe Act D-Dosen nicht weiter erhöht wird, die Summe aus spezifisch und spontan freigesetztem Chrom also weitgehend konstant bleibt.

4.3. Einfluß von Interferon auf die NK-Lyse von Leukämie-Zellen

Wie schon in 1.2. und in 3.2.1. ausgeführt, steigert Interferon die Lyse der Targetzellen durch NK-Zellen in vielen Tumorsystemen. Verschiedene Autoren berichteten in neueren Arbeiten, daß humane frisch isolierte AL-Blasten und CLL-Zellen durch nicht aktivierte NK-Zellen nur gering lysierbar sind. Durch Vorbehandlung der Effektorzellen konnte die Lyse der Leukämie-Zellen wesentlich gesteigert werden (12, 119, 138, 201). Wir haben die Lyse von AL-Blasten durch Effektorzellen, die mit oder ohne IFN vorinkubiert worden sind, nur in wenigen Experimenten verglichen. Tabelle 3.2. (3.2.1.) zeigt eine deutliche Steigerung der Lyse der AL-Zellen durch Aktivierung der Effektor-PBM mit Interferon, übereinstimmend mit den zitierten Berichten.

4.4. Einfluß von Actinomycin D auf die Lyse von AL-Blasten durch aktivierte und nicht aktivierte PBM

4.4.1. Kooperativer Effekt von Act D und IFN

Durch 4-stündige Vorinkubation der Leukämie-Zellen mit Actinomycin D konnte deren Lyse durch PBM gesteigert werden (siehe Tabelle 3.4. und Abbildung 3.3.), ohne daß Actinomycin D direkt toxisch auf die Zellen wirkt, gemessen am konstanten oder auch reduzierten Spontanrelease (Tabelle 3.6.a, Spalte 10). Durch Aktivierung der Effektor-PBM mit Fibroblasten-Interferon konnte die Lyse der Act D-behandelten Zellen weiter gesteigert werden, wie der Vergleich der Abbildungen 3.3. und 3.4.

zeigt (siehe auch Tabelle 3.6.a). Dies bedeutet, daß sowohl nach Aktivierung der Effektorzellen als auch Sensibilisierung der Tumorzellen jeweils eine Zellfraktion nicht lysiert wird, die erst durch das Einwirken von aktivierten PBM auf sensibilisierte LBC lysiert werden kann. Um den Actinomycin D-Effekt auf die Lysierbarkeit der LBC deutlicher zu demonstrieren, wurden meist aktivierte Effektorzellen eingesetzt (Tabelle 3.5. und 3.6.).

4.4.2. Dosisabhängigkeit der Actinomycin D-Wirkung

Die Steigerung der Lyse von frischen LBC durch Actinomycin D zeigt eine deutliche Dosisabhängigkeit. Der optimale Effekt ist nicht bei einer möglichst hohen Dosis zu beobachten, sondern in einem umschriebenen Dosisbereich (siehe 3.2.2.3.1.). Bei hohen Act D-Dosen kommt es zu einem mehr oder weniger starken Abfall der Lyse und zu einem Anstieg im Spontanrelease. Daher wurden in den meisten Experimenten mehrere Act D-Dosen getestet und die Dosis gewählt, bei der bei möglichst unverändertem Spontanrelease eine Steigerung der Lyse am besten demonstrierbar war.

Die Actinomycin D-Dosen, die in diesem System die Tumorzellen am besten gegen die NK-Zellen sensitivierten, waren niedriger als die Konzentration von 25-40 µg/ml, die die Lyse einer Meerschweinchen-Hepatom-Zelllinie durch Antikörper und Komplement steigert (161, 162), aber vergleichbar oder gleich der Dosis von 1 µg/ml die im Maus-Fibroblasten-System von Kunkel und Welsh die Lyse einer Fibroblastenlinie steigert. Allerdings lag in deren System die Vorinkubationszeit bei 17-24 h (100), während für die vorliegende Studie die frischen Leukämie-Zellen

nur für 4 h mit Actinomycin D vorinkubiert worden sind. Bei längeren Vorinkubationszeiten bis zu 6 h ergaben sich zwar höhere Lysen, wie in 3.2.2.3.2. ausgeführt, doch fanden wir nach Übernachtinkubation der Tumorzellen Vg* große Unterschiede im Spontanrelease und der Zahl der überlebenden Zellen. Dabei waren S und der Anteil der toten Zellen bei den Zellen, die mit Act D vorinkubiert worden waren, deutlich vermindert.

4.4.3. Unwirksamkeit von Act D bei vier von acht Leukämien

Bei vier von acht getesteten Leukämien konnte die Lyse nicht durch die getesteten Act D-Dosen gesteigert werden. In zwei Fällen (Hu* und Su*) wurden die Leukämie-Blasten zwar durch interferonaktivierte PBM lysiert, diese Lyse konnte aber nicht durch Actinomycin D erhöht werden. Allerdings ließ sich die Lyse der +Act D-Su*-Zellen durch Interferonaktivierung der Effektorzellen steigern (Exp. 16, Tab. 3.6.). Bei den Leukämien Mi* und Rd* war überhaupt keine Lyse demonstrierbar. Dies könnte darauf beruhen, daß Mi*- und Rd*-Zellen nicht von NK-Zellen erkannt werden können, da sie keine NK-Targetstrukturen tragen. Andererseits könnten die getesteten Spender keine NK-Zellen besitzen, die die Targetstrukturen dieser Zellen erkennen. In diesem Fall wäre eine Lyse durch andere Spender möglich. Die Literatur weist darauf hin, daß in einigen Tumorsystemen die Lyse von der Kombination von Effektor- und Targetzellen abhängt (119, 137).

Eine Lysierbarkeit ohne Steigerung, wie im Fall der Leukämien Hu* und Su*, beruht am wahrscheinlichsten darauf, daß alle lysierbaren Zellen schon ohne Vorbe-

handlung mit Act D durch die aktivierten PBM lysiert werden. Als alternative Erklärung wäre es möglich, daß der wirksame Dosisbereich für die Vorinkubation mit Act D für diese Zellen außerhalb des getesteten Bereichs von 0,1 bis 5 µg/ml liegt.

4.4.4. Wirkmechanismus von Actinomycin D

Die Autoren der zitierten Arbeiten, in denen die Lysierbarkeit von Tumorzelllinien durch NK-Zellen mit Protein- oder RNA-Synthesehemmern gesteigert werden konnte (27, 74, 100), interpretieren diesen Effekt als Hemmung eines Proteinsynthese-abhängigen Resistenzmechanismus gegen die Lyse durch NK-Zellen. Dabei gehen sie davon aus, daß in-vivo wachsende oder entstehende Tumorzellen einem Selektionsdruck durch NK-Zellen ausgesetzt sind, der die Entwicklung NK-resistenter Zellen bevorzugt. Verschiedene Autoren zeigten, daß in-vivo passagierte Tumorzelllinien weniger NK-sensibel sind als die entsprechenden in-vitro-Kulturen (17, 27, 65, 93). Häufig beruht diese Resistenz auf einer verminderten Expression von NK-Targetstrukturen (17, 93), die allgemein gut mit der Lysierbarkeit einer Zelle durch NK-Zellen korreliert (65, 152). Eine Reihe von Zellen sind aber nach in-vivo-Passage oder inherent weniger NK-sensibel, aber besitzen eine unveränderte Fähigkeit, die Lyse NK-sensibler Targetzellen im CTI zu hemmen (17, 27, 65, 100). Bei diesen Zellen muß also eine andere Ursache für die Resistenz gegen NK-Zellen vorliegen als die Abwesenheit von NK-Targetstrukturen.

Die Ursachen für die gesteigerte Lysierbarkeit der 4 Leukämie-Zellen Ri, Sc, St und Vg könnten vielfältig sein. Triviale Gründe wären Artefakte und Fehlinterpretation durch eine er-

höhte Empfindlichkeit gegen den Entzug wichtiger Nahrungsfaktoren durch die "Effektorzellen", durch schnellere Chrom-Freisetzung aus sterbenden Zellen, ohne daß mehr Zellen lysiert werden oder durch Selektion NK-sensibler Zellen. Die Ergebnisse der CTI-Experimente mit autologen Tumorzellen, die mit oder ohne Actinomycin D vorinkubiert worden waren, sprechen gegen diese Selektion. Dies wurde bereits in 4.2. diskutiert. Gegen eine reine Stoffwechselkonkurrenz durch die Effektorzellen sprechen die CTI-Ergebnisse mit den Zelllinien K 562, Molt 4 und P 815. Diese Tumorzellen sind sehr groß und stoffwechselaktiv, gemessen an ihrer Teilungsrate. Die Zugabe solcher Zellen sollte zu einer Steigerung der Lyse der LBC führen, wenn deren Zerfall nur durch den Verbrauch von "Faktoren" bedingt wäre. In Anwesenheit von oder ohne Effektorzellen hemmen sie stattdessen die spezifische bzw. spontane Chrom-Freisetzung aus Vg*-Blasten wie in 3.4.2. demonstriert. Auch PBM selbst können einen Schutzeffekt ausüben und die Chrom-Freisetzung unter den Spontanrelease senken. Dagegen kann man argumentieren, daß nur PBM und diese nur dann die entscheidenden Faktoren verbrauchen, wenn eine gesteigerte Lyse gemessen wird. Diese Möglichkeit kann hier nicht widerlegt werden, doch gibt es dafür keinerlei Hinweis.

Eine schnellere Chrom-Freisetzung aus zerfallenden Zellen, die im 5,5 h-Test zu einer scheinbar erhöhten Lyse führt, wird dadurch unwahrscheinlich, daß der Spontanrelease durch die Act D-Behandlung meist nicht gesteigert wird und dennoch eine gesteigerte Lyse meßbar ist. Auch nach 7,5 h setzten +Act D-Vg-Zellen nicht vermehrt Chrom frei, wie in 3.2.2.3.3. ausgeführt. Nach 16 h betrug der Spontanrelease 70,8% für -Act D-Vg*-Zellen und 76,6% für +Act D-Vg*-Zellen. Eine schnellere Chrom-Freisetzung aus zerfallenden Zellen sollte sich auch durch einen erhöhten Spontanrelease durch schnellere Chrom-Freisetzung aus spontan zerfallenden Zellen bemerkbar machen.

Subtilere Möglichkeiten der Actinomycin D-Wirkung, die zu einer wirklich erhöhten spezifischen Lyse durch NK-Zellen führen, wären

- a) Änderung des Differenzierungszustandes der Targetzellen (Maturation)
- b) Beeinflussung des schützenden Effektes von Interferon auf die Targetzellen
- c) Wechselwirkung mit der Membran oder dem Stoffwechsel der Targetzellen.

ad a):

Durch Induktion von Differenzierungsvorgängen kann die NK-Suszeptibilität bestimmter Zelllinien verändert werden. Je nach Zelllinie führt die Differenzierung der Zellen in ein reiferes Stadium zu einer vermehrten oder verminderten NK-Suszeptibilität (26, 37, 38). Diese Veränderungen der Suszeptibilität gehen meist mit einer erhöhten oder reduzierten Fähigkeit einher, NK-Zellen zu binden oder im CTI die Lyse von NK-Targetzellen zu hemmen, was als Folge einer verminderten Expression von NK-Targetstrukturen interpretiert wird. Die Differenzierung in diesen Modellsystemen wurde durch drei- bis fünftägige Inkubation der Zelllinien mit verschiedenen Agentien wie Natrium-Butyrat, Hämin, Joddesoxyuridin oder 5-Azazytidin induziert. Im Gegensatz hierzu kann die Lysierbarkeit von LBC durch 3,5-4 h Inkubation in Actinomycin D gesteigert werden und die Ergebnisse der CTI-Experimente sprechen gegen eine vermehrte Expression von NK-Targetstrukturen. Daher ist es sehr unwahrscheinlich, daß die gesteigerte Lyse frischer LBC auf einer Differenzierung der Tumorzellen durch Actinomycin D beruht. Gidlund et al. (38) berichteten allerdings, daß die verminderte NK-Suszeptibilität der Histiozytomzelllinie U-937 nach der Differenzierung nicht von einer verminderten Expression von NK-Targetstrukturen begleitet wird und Clark et al. (26) verwendeten Induktoren, die auch zytostatisch wirken, wie Azazytidin. Da-

her ist eine Ähnlichkeit der Wirkungsmechanismen von Actinomycin D in unserem System und der Wirkung der Differenzierungsinduktoren in den zitierten Berichten nicht ausgeschlossen.

ad b):

Bestimmte Targetzellen können im NK-Test die Effektorzellen zur Produktion von Interferon stimulieren. Das produzierte Interferon soll in Langzeittests (18-24 h) durch Aktivierung der Effektorzellen für 70-90% der zytotoxischen Aktivität gegen diese Targetzellen verantwortlich sein. Die Lyse durch voraktivierte Effektorzellen ist allerdings nicht von der Interferonproduktion im Test abhängig. Andererseits kann Interferon bestimmte "normale" und Tumor-Targetzellen vor der Lyse durch NK-Zellen schützen. Dieser IFN-Effekt geht meist mit einer verminderten Expression von NK-Targetstrukturen einher und kann durch Actinomycin D gehemmt werden (187). Falls die Interferonproduktion im Ansatz in unserem Testsystem eine Rolle für die Targetresistenz spielt, könnte Act D durch Hemmung des schützenden Interferoneffektes auf die Targetzellen wirken. Wenn aber das im Testansatz produzierte Interferon so schnell wirkt, daß eine gesteigerte Lyse durch Hemmung des Interferoneffektes meßbar wird, dann sollte sich dies auch im Cold-Target-Inhibition-Test bemerkbar machen, da, wie oben erwähnt, die verminderte NK-Sensibilität nach Behandlung der Targetzellen mit Interferon auf einer Reduktion der NK-Targetstrukturen beruht. Um diesen Punkt weiter abzuklären, wären Studien über die Interferonproduktion im Testansatz nötig.

ad c):

Actinomycin D wirkt als RNA- und DNA-Synthesehemmer, indem es zwischen G-C-Basenpaaren des DNA-Doppelstranges interkaliert (76, 169). Andere Autoren steigerten die NK-Suszeptibilität von Zelllinien mit den Proteinsynthesehemmern Cycloheximid und Puromycin (27, 74, 100) und schlossen daraus, daß diese Sensitivierung durch die Hemmung eines Proteinsynthese-abhängigen Reparatonsmechanismus beruht. Schlager et al. (161, 162, 163) fanden jedoch, daß nach Behandlung einer Meerschweinchen-Hepatom-Zelllinie mit Adriamycin, Puromycin oder Actinomycin D die Lysierbarkeit der Zellen durch Antikörper und Komplement nicht mit der Protein-, DNA- oder RNA-Synthese korreliert, sondern mit parallelen Veränderungen der Lipidsynthese und Lipidkomposition dieser Zellen. Die gesteigerte Lyse von P 815 Maus-Mastozytom-Zellen durch CTL nach Behandlung mit Mitomycin C korreliert besser mit der Oberflächenladung und der Lipidsynthese und -komposition als mit der Protein-, RNA- oder DNA-Synthese (160). Mitomycin C-behandelte Zellen haben einen erhöhten Anteil polarer Phospholipide, besonders Phosphatidylcholin und Sphingomyelin, und verminderte Dichte negativer Oberflächenladungen. Schlager et al. schließen daraus, daß die Lysierbarkeit der P 815-Zellen durch die Beeinflussung von physikalischen Eigenschaften der Zelloberfläche verändert wird, statt durch Hemmung der Makromolekülsynthese.

Ähnliches könnte auch für die Lyse durch NK-Zellen gelten. Yogeewaran et al. (199) fanden eine Korrelation zwischen der NK-Resistenz von Varianten des Maus-NK-Standardtargets YAC-1 und sowohl deren Oberflächengehalt an Sialinsäure, die die negative Oberflächenladung erhöht, als auch deren Zusammensetzung der Membranglycosphingolipide. Wie Mitomycin C in der Mauszelllinie P 815 die Lysierbarkeit durch CTL steigert, könnte Act D den Lipid-Stoffwechsel der LBC so beeinflussen, daß eine erhöhte Lysierbarkeit durch PBM resultiert.

Weitere mögliche Wirkmechanismen von Act D ergeben sich aus Arbeiten von Sinha und Mitarbeitern. Act D und andere Zytostatika führen zu Veränderungen der Elektronenspinresonanz von Erythrozytenmembranen und P 815-Zellen, die auf eine Konformationsänderung von Membranproteinen hindeuten (165). Des weiteren stimuliert Act D die Produktion von Sauerstoffradikalen durch mikrosomale Proteine. Act D-Derivate, die eine stärkere in-vivo Aktivität gegen P 388 Leukämie-Zellen besitzen, aber schwächer an DNA binden, stimulieren die Produktion von O_2 -Radikalen stärker als Act D (166). Veränderungen der Membranproteinkonformation oder Produktion von Sauerstoffradikalen könnten ebenfalls zu einer verminderten Resistenz der LBC gegen NK-Zellen führen. Die letztgenannte Möglichkeit ist besonders unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Roder et al. interessant, die fanden, daß NK-Zellen während des lytischen Prozesses ebenfalls Sauerstoffradikale produzieren (150).

Die hier vorgelegten Daten lassen keinen sicheren Schluß über den Wirkmechanismus von Act D bei der Steigerung der Lysierbarkeit frischer Leukämie-Zellen zu. Da unbehandelte Leukämie-Zellen die Lyse markierter Leukämie-Zellen ebenso gut hemmen wie Leukämie-Zellen, die mit Act D vorinkubiert worden waren, aber besser lysierbar sind, sind Mechanismen unwahrscheinlich, die auf einer erhöhten Expression von Targetstrukturen beruhen, also Differenzierung und Beeinflussung der Wirkung im Assay produzierten Interferons. Dasselbe gilt für die Selektion NK-sensibler Zellen. Der Angriffspunkt von Act D im NK-Lyse-Mechanismus liegt daher entweder in der Programmierungsphase oder in der Effektorzell-unabhängigen Lyse der Targetzellen (siehe 1.2.). Da es sich bei den NK-Zellen möglicherweise um Zellen mit multipler Spezifität handelt, erfordert eine Hemmung der NK-Lyse im CTI nicht nur eine Konkurrenz um NK-Rezeptoren, sondern auch eine Konkurrenz um den lytischen Apparat der Effektorzellen. Aus ihren elektronenmikroskopischen

Studien lytisch aktiver NK-Zellen und aus Analogien mit CTL schließen Carpen et al. (23), daß NK-Zellen mehrere Targetzellen mit einem lytischen Apparat sequentiell lysieren. Die relativ NK-resistente Zelllinie Raji bildet zwar eine mit K 562 vergleichbare Zahl von Target-Effektor-Zellkonjugaten, aber in diesen Konjugaten ist der Golgi-Apparat der NK-Zellen zufällig orientiert. Raji-Zellen sollen die Lyse von K 562 im CTI nicht inhibieren (131). Daraus ist zu schließen, daß die Hemmung im CTI nicht nur durch eine Konkurrenz um die NK-Rezeptoren auf den Effektorzellen bedingt ist, sondern auch eine Inanspruchnahme des lytischen Apparates voraussetzt. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, daß NK-Target-Zellen die ADCC-Lyse im CTI inhibieren können (125). ADCC (=antibody-dependent, cellular cytotoxicity) ist eine Zellfunktion, bei der Antikörper bedeckte Targetzellen durch Zellen, die den Fc-Teil der Antikörper mittels eines Fc-Rezeptors erkennen, lysiert werden. Diese Funktion kann auch von NK-Zellen ausgeübt werden (16). Für diese Studie bedeutet das, daß Act D-behandelte und unbehandelte LBC wahrscheinlich gleich viele Lyse-Versuche durch NK-Zellen auslösen, diese aber bei den +Act D-LBC erfolgreicher sind. Der Angriffspunkt von Act D im lytischen Zyklus liegt daher am wahrscheinlichsten in der späten Programmierungsphase ("lethal hit") oder der Effektorzell-unabhängigen Lyse nach Hiserodt et al. (siehe 1.3.).

Die Lyse der NK-Standard-Targetzellen K 562 und Molt 4 wird durch Actinomycin D im getesteten Dosisbereich nicht gesteigert, sondern reduziert (Tabelle 3.6.d, und 3.3.3.). Dies könnte zum einen darauf beruhen, daß die Zelllinien keiner in-vivo-Selektion unterliegen und daher keinen Act D-sensitiven Resistenzmechanismus bereit halten. Andererseits könnten diese Zellen sich in einem Zustand befinden, der z.B. durch den Einfluß von Act D auf die Zellmembran oder den Lipidstoffwechsel bei sensitivierbaren LBC erst hervorgerufen

wird und einer optimalen Lysierbarkeit entspricht. Durch Act D wird der Zustand bei diesen Zellen womöglich in einen sub-optimalen Bereich verschoben. Dies könnte auch für die Herabsetzung der spezifischen Lyse von sensitivierbaren LBC bei hohen Act D-Dosen verantwortlich sein. Die spezifische Lyse von K 562 wird auch durch die Proteinsynthesehemmer Cycloheximid, Puromycin und Emetin reduziert (74). Die Ursache dafür ist unklar.

4.5. Effektorzellen und Spezifität des Act D-Effektes

Zarling et al. (201) fanden, daß Interferon-aktivierte Effektorzellen gegen frische AL-Zellen im 5 bis 7 h-Test nicht phagozytische und nicht plastikadhärente Lymphozyten sind und Rezeptoren für den konstanten Teil von IgG (FcR) tragen. Es handelt sich also höchstwahrscheinlich um NK-Zellen. Das gleiche fanden Pattengale et al. für IFN-aktivierbare Effektorzellen gegen CLL-Zellen (138). In derselben Arbeit zeigt diese Gruppe, daß lysierbare CLL-Zellen mit der NK-Standard-Targetzelle K 562 um NK-Effektorzellen konkurrieren, da die Lyse der CLL-Zellen durch unchromierte K 562-Zellen gehemmt wird. Da Ziegler-Heitbrock und Riethmüller kürzlich fanden, daß mit Actinomycin D behandelte Mausfibrosarkomzellen in einem 7 h CRA von humanen Makrophagen lysiert werden (207), wäre es möglich, daß die Effektorzellen gegen Actinomycin D-behandelte LBC ebenfalls Makrophagen sind. Die Inhibitionsexperimente mit NK-Standard-Targetzellen K 562 und Molt 4 zeigen, daß diese mit den Actinomycin D-behandelten LBC um die Effektorzellen konkurrieren und die Lyse sogar stärker hemmen als die LBC selbst (3.4.2., Tabelle 3.8.). Da K 562 gegen die Lyse durch Makrophagen relativ resistent ist (60), sprechen diese Ergebnisse gegen Makrophagen als Effektor-

zellen in diesem System. Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung von Ziegler-Heitbrock, daß Behandlung der Effektorzellen mit dem monoklonalen Antikörper VEP 13 und Komplement die Lyse von K 562, Molt 4 und Act D-behandelten Vg*-Leukämie-Zellen stark reduziert, während die Aktivität gegen die Mausfibrosarkomzellen nicht reduziert wird (Manuskript in Vorbereitung). Zusammengefasst sprechen diese Beobachtungen dafür, daß Leukämie-Zellen nach Inkubation mit oder ohne Act D von NK-Zellen lysiert werden. Zarling et al. fanden aber auch, daß die Aktivität aktivierter NK-Zellen gegen allogene AL-Zellen nicht streng mit der lytischen Aktivität gegen K 562 korreliert (201) und Ortaldo et al. (131) fanden keine Inhibition der Lyse von K 562 durch verschiedene frische AL-Zellen. Sie schlossen daraus, daß unter den NK-Zellen eine Heterogenität der Effektorzellen und/oder Rezeptoren für die NK-Targetstruktur herrscht (61, 201). Eine Reihe von Studien bestätigen dies und es gilt heute als weitgehend sicher, daß mehrere Targetstrukturen durch NK-Zellen erkannt werden können und einzelne Effektorzellen möglicherweise Rezeptoren für mehrere Targetstrukturen tragen. Dies ergibt sich aus CTI-Studien (60, 137, 175), Untersuchungen mit einem Antikörper (121) und der Isolation von Oberflächenmolekülen von NK-sensiblen Zelllinien (124). So kann mit dem Antikörper 13.1 gegen Lymphozyten die Lyse von myeloischen und erythropoetischen Zelllinien einschließlich K 562 reduziert werden, während die Lyse von T-Zelllinien einschließlich Molt 4 und der meisten B-Zelllinien nicht beeinflusst wird. Gleichzeitig kann die Inhibition der Lyse einer T-Zelllinie durch K 562 im CTI durch Behandlung der Effektorzellen mit 13.1 vermindert werden (121). Obexer et al. (124) fanden unterschiedliche Expression von Oberflächenmolekülen, die die Lyse durch NK-Zellen kompetitiv hemmen können, auf K 562, Molt 4 und anderen Zellen. Daher lassen sich unsere Beobachtungen zusammen mit denen anderer (131, 201) am besten durch die Annahme er-

klären, daß LBC Targetstrukturen tragen, die von denselben Effektorzellen erkannt werden, die auch K 562 und/oder Molt 4 lysieren, daß die NK-Standard-Targetzellen aber mehr oder zusätzliche Targetstrukturen tragen, sodaß sie zwar die Lyse von LBC inhibieren, aber ihre eigene Lyse durch LBC nur schwach gehemmt werden kann.

Manche Autoren glauben, daß IFN-aktivierte Effektorzellen mehr oder weniger alle Targetzellen unspezifisch lysieren können. Eine Steigerung der Lysierbarkeit von Targetzellen zusammen mit einer Aktivierung der Effektorzellen wäre dann wenig sinnvoll, zumindest wenn man an therapeutische Maßnahmen denkt. Schon die Tatsache, daß nur 4 von 8 getesteten Leukämien durch die getesteten Act D-Dosen in ihrer Sensitivität gegen die NK-Lyse gesteigert werden konnten, spricht gegen die Annahme, daß Act D alle Zellen gegen NK-Zellen empfindlich macht. Ebenso wenig wurden PBM normaler Spender nach Inkubation mit Act D lysiert (3.3.1.) und auch PHA-Blasen, die gute Targetzellen für zytotoxische T-Zellen sind, werden nach Inkubation mit Actinomycin D nicht durch aktivierte NK-Zellen lysiert (3.2.2.). Da andererseits die NK-Resistenz von untransformierten Fibroblastenzelllinien, die die Lyse NK-sensibler Targetzellen inhibieren können, durch Act D oder Proteinsynthesehemmer überwunden werden kann (27, 74), ist wahrscheinlich auch im humanen System der hier beschriebene Effekt von Act D nicht auf maligne Zellen beschränkt.

4.6. Mögliche therapeutische Relevanz

4.6.1. In-vivo Bedeutung des NK-Phänomens

Da das NK-Phänomen bei der Suche nach einer spezifischen Antwort von Tumorträgern gegen ihren Tumor gefunden worden war, wurde schon bald - in Anbetracht des breiten Reaktionsspektrums der NK-Zellen gegen maligne Zellen (128, 177, 179) - über eine wesentliche Rolle dieses Phänomens bei der "Immunsurveillance" (20, 21), der Verhütung malignen Wachstums durch das Immunsystem, spekuliert (62, 66, 80, 89, 157). Die Beobachtung, daß "nackte" nu/nu-Mäuse mit einer rezessiv vererbten Thymusaplasie und daher einen defekten T-Zellsystem nicht zu vermehrtem spontanen (8, 172) oder chemisch induzierten malignen Wachstum neigen und auch virusinduziertes Tumorstadium relativ gut unterdrücken können (171), stellte die Bedeutung des bisher favorisierten T-Zellsystems für die Immunsurveillance in Frage (118, 172). Da nackte Mäuse eine stärkere NK-Aktivität besitzen als heterozygote +/- oder homozygote +/+ Tiere desselben Stammes (65, 92), nahm man an, daß die NK-Zellen im Sinne der Immunüberwachungstheorie von Burnet (20, 21) wirksam sind. In einem Kommentar schrieb Baldwin 1977: "... attention is being focused on so-called 'natural killer cells' since these fit almost exactly the immunologists' design for a surveillance cell in being able to recognize and kill malignant cells without previous sensitisation" (8).

Tatsächlich ergaben schon sehr frühe Arbeiten eine Korrelation zwischen der in-vitro NK-Aktivität gegen NK-suszeptible Tumor-Zelllinien mit der in-vivo Resistenz gegen das Wachstum kleiner Dosen dieser Tumorzellen. Mausstämme konnten in "high reactors" und "low reactors" eingeteilt werden (92, 93, 178). F₁-Hybride des "low reactor"-Stammes A.Sn mit verschiedenen gut- und schwach-reaktiven Stämmen zeigten - je nach ihrer in-vitro Aktivität gegen die NK-suszeptible YAC-1 A.Sn Lymphom-Zelllinie - eine hohe oder geringe Tumorzinidenz

nach Einpflanzung von YAC-1-Zellen (94). Auch die bei Mäusen charakteristische stark altersabhängige Schwankung der NK-Aktivität in-vitro korreliert gut mit der Resistenz gegen syngene oder H2-identische Tumoren in-vivo (49, 164).

Da Tumorwachstum längere Zeit benötigt, kann in allogenen Systemen ein T-Zell-Effekt nicht ausgeschlossen werden. Die Korrelation von NK-Aktivität und Tumorresistenz verschiedener Stämme könnte koinzidentuell sein, oder auf einer tieferen gemeinsamen Ursache beruhen. Deshalb konstruierten Haller et al. (49) Knochenmarkchimären mit H2-identischen (H2 ist das Haupt-Histokompatibilitätssystem der Mäuse) Knochenmark (KM)-Spendern und -Empfängern unterschiedlicher NK-Aktivität. Die in-vivo Resistenz der Chimären gegen die H2-identische YAC-1-Linie, wie die in-vitro Aktivität gegen YAC-1, wurde dabei nur von der in-vitro NK-Aktivität der Knochenmarkspender bestimmt, nicht von der der Empfänger. Das transplantierte Knochenmark enthielt keine reifen T-Zellen (anti Thy-1+C' behandelt). Die Abstoßung der Tumortransplantate war nicht thymusabhängig, da thymektomierte Knochenmarkempfänger keine verminderte Tumorresistenz zeigten.

In neueren Systemen konnten weitere Hinweise für eine wichtige Rolle der NK-Zellen bei der Eindämmung malignen Wachstums erbracht werden. Wesentliche Ansatzpunkte dabei sind:

1. Untersuchung der Tumorresistenz von Mutanten mit hoher NK-Aktivität oder mit einem NK-Defekt. Nackte Mäuse zeigen eine erhöhte NK-Aktivität verglichen mit normalen Mäusen desselben Stammes (s.o.). Die rezessive beige-Mutation bg/bg betrifft das Melanozytensystem, die Granulozytenfunktion und die vorhandenen aber funktionell gestörten NK-Zellen (148, 151). Beige Mäuse besitzen also eine verminderte NK-Aktivität, während das B- und T-Zellsystem, sowie die Makrophagen intakt sein sollen.

2. Untersuchungen der Tumorigenität NK-sensibler und NK-resistenter Tumoren oder Subklone.
3. Untersuchung des schnellen Abbaus von radioaktiv markierten Tumorzellen in-vivo (61, 145) im in-vivo Clearance Assay (ivCA): Markierte Tumorzellen werden i.v. verabreicht und die Anreicherung bzw. der Abbau der Radioaktivität in bestimmten Organen wird gemessen. Riccardi et al. (145) konnten zeigen, daß NK-suszeptible Tumorzellen innerhalb weniger Stunden aus der Lunge eliminiert werden. Das Ausmaß und die Geschwindigkeit dieser Elimination korrelieren mit der in-vitro NK-Aktivität des Empfängers gegen den Tumor. Durch immunpharmakologische Eingriffe, die die NK-Aktivität des Empfängers verändern, können sie entsprechend erhöht oder vermindert werden. Der schnelle Tumorabbau spricht nach allgemeinen Vorstellungen gegen die Beteiligung von T-Zellen oder Makrophagen. (Humane Makrophagen können allerdings Act D-behandelte Wehi 164 Maus-Fibrosarkomzellen im 7 h CRA lysieren (207)).
4. Vergleich der in-vivo NK-Aktivität unter verschiedenen Bedingungen (1., 2., 5., 6.) durch i.v. Inokulation von Tumorzellen und Zählen der entstehenden artifiziellen Metastasen. Korrelation mit dem ivCA.
5. Immunpharmakologische Beeinflussung des NK-Systems: Durch Interferon-Induktion in-vivo kann die NK-Aktivität in-vitro gesteigert werden. Mit Antikörpern gegen NK-Zellmarker kann die NK-Aktivität in-vivo und in-vitro reduziert werden. Das gilt im Maussystem für Anti-NK-Sera (α -NK) (39, 50, 140) und für Anti-asialo-GM1 (α -asGM1) bei der Ratte (10) und der Maus (45, 87, 88). Cyclophosphamidbehandlung (50, 193) und fraktionierte Bestrahlung (193) der Tiere reduzieren ebenfalls die in-vivo und auch die in-vitro NK-Aktivität der Tiere.

6. Rekonstitutionsexperimente: Behebung einer natürlichen (bg/bg) oder artifiziellen selektiven NK-Dysfunktion in-vivo durch Transfer von Zellfraktionen mit unterschiedlicher NK-Aktivität. Nachweis, daß die rekonstituierende Aktivität an NK-Zellen gebunden ist.

Die Ergebnisse wichtiger neuerer Arbeiten mit den genannten Methoden und deren Kombinationen seien kurz zusammengefaßt:

Nackte Mäuse zeigen eine erhöhte Resistenz gegen lokales Wachstum syngener NK-sensibler Tumoren, nicht aber gegen NK-resistente Tumorklinien (nach 151). Die Elimination von Tumorzellen aus der Lunge im ivCA ist beschleunigt und das Wachstum artifizieller Metastasen vermindert (45). Beige-Mäuse dagegen zeigen eine verminderte NK-Aktivität in-vitro (84, 181), eine verminderte Resistenz gegen subcutane Inokulation NK-sensitiver Tumoren (84, 181), bei normalem Wachstum NK-resistenter Tumoren (84), eine erhöhte Zahl artifizieller Lungen- und Lebermetastasen (45, 84, 181, 193), eine verminderte Elimination von Tumorzellen aus der Lunge im ivCA (45, 84, 193) und selbst eine erhöhte Anzahl spontaner Metastasen aus einem lokal wachsenden Tumor (45, 181). Ebenso ist die Fähigkeit, allogenes und semisyngenes Knochenmark abzustößen, reduziert (193). α -asGM1-behandelte Mäuse und Ratten weisen ähnliche Defekte auf. Sie zeigen ein vermehrtes lokales Tumorstwachstum (87, 88) NK-sensitiver Tumoren, nicht dagegen NK-resistenter Subklone (88), vermehrte Tumor-Retention im ivCA (10, 45) und vermehrte spontane und artifizielle Metastasen (45). Durch α -NK1-Behandlung in-vivo wird parallel zur in-vitro NK-Reduktion die in-vivo Clearance syngener und allogener Tumoren vermindert (140). Cyclophosphamid (CY) vermehrt das Angehen artifizieller Metastasen in der Lunge (50, 193) und fraktionierte Bestrahlung (4 x wöchentlich 175 r) ver-

mindert die Resistenz gegen allogenenes KM und parentales Knochenmark bei F_1 -Hybriden (Hybrid-Resistance) und induziert das Entstehen von Leukämie in 80% der bestrahlten C57Bl6 Mäuse. Demgegenüber konnte mit IFN-induzierenden Agentien wie Polyinosyl-Polycytidyl-Säure (poly I:C) oder Lymphochoriomenigitis-Viren (LCMV) eine erhöhte Resistenz gegen Tumoren bzw. eine partielle Restitution kongenital oder artifiziell verminderter Tumoresistenz in verschiedenen Systemen erreicht werden (88, 181).

In-vivo Behandlung nackter Mäuse mit einem Anti-Interferon-Serum ermöglicht dagegen das invasive Wachstum virusinfizierter Humantumoren, gegen die nackte Mäuse sonst resistent sind. Dieselben nicht infizierten Tumoren, die normalerweise in nackten Mäusen nur begrenzt und gut abgekapselt wachsen, breiten sich in Anti-IFN behandelten nackten Mäusen invasiv und metastatisch aus (144).

Von besonderer Bedeutung sind in diesem Zusammenhang Rekonstitutionsexperimente (10, 50, 193). Die CY-induzierte Resistenzminderung gegen artifizielle Lungenmetastasen konnte durch Milzzellen behoben werden, nicht aber durch Milzzellen, die vorher mit α -NK1 und C' behandelt worden waren. Durch Injektion von LGL in mit α -asGM1 NK-deprimierte Ratten konnte deren in-vitro NK-Aktivität, als auch deren in-vivo Tumorzellelimination im ivCA partiell wieder hergestellt werden.

Besonders interessant sind die Experimente von Warner und Dennert (193). Mit einem Zellklon mit NK-Funktion (29) konnte die Fähigkeit NK-defizienter Mäuse (bg/bg, CY-behandelt oder nach fraktionierter Bestrahlung), allogenenes Knochenmark oder Tumormetastasen abzustoßen, verbessert werden. Ebenso gelang es mit mehreren Injektionen der geklonten NK-ähnlichen Zellen, die Entwicklung der strahleninduzierten Thymus-Leukämien zu verhindern. Da in den Experimenten, in denen die NK-Funktion unterdrückt wird, die Spezifität der Maß-

nahmen oft nicht unbestritten ist (45, 173), geben diese Rekonstitutionsexperimente einen wichtigen Hinweis auf die Bedeutung und wesentliche Beteiligung von NK-Zellen an der Abwehr NK-sensibler Tumoren.

Solange nur gezeigt wird, daß die in-vitro oder in-vivo NK-Aktivität mit der Resistenz gegen NK-suszeptible Tumoren korreliert, bewegt sich die Argumentation im Kreis. Eine Rolle der NK-Zellen in der natürlichen Tumorentstehung bzw. Tumorabwehr ist dadurch nicht bewiesen. Weitere Beobachtungen geben aber auch erste Hinweise auf eine Bedeutung der NK-Aktivität in-vivo und der NK-Suszeptibilität von Tumorzellen für die Entstehung und spontane Ausbreitung von Tumoren.

Collins et al. (27) transformierten eine nicht tumorigene Fibroblastenlinie in-vitro. Die transformierten Zelllinien waren NK-sensibler als die Ausgangszelllinie und bildeten in NK-defizienten Tieren Tumoren, nicht aber in Tieren mit intaktem NK-System. Nach in-vivo Passage dieser Linie wurden NK-resistente Sublinien isoliert, die auch in normalen Tieren zu Tumoren auswuchsen.

Die schon erwähnten Rekonstitutionsexperimente von Warner und Dennert (193), in denen die leukämogene Wirkung einer fraktionierten Bestrahlung, die auch zu einer tiefen NK-Suppression führt, durch NK-aktive Zellen reduziert werden konnte, geben ebenfalls einen deutlichen Hinweis auf die Bedeutung des NK-Systems bei der Entstehung malignen Wachstums. In diesem Zusammenhang scheint es uns interessant, daß die meisten chemischen und viralen Kanzerogene die NK-Aktivität z.T. für lange Zeit vermindern (13, 32, 68). Der Nachweis, daß bg/bg-Mäuse eine erhöhte Tumorrates oder eine verminderte Resistenz gegen induzierte Entstehung primärer Tumoren aufweisen, steht allerdings noch aus. Das menschliche Pendant zur bg-Mutation, das Chediak-Higashi-Syndrom, soll in 80% zu einer malignen lymphoproliferativen Neoplasie führen (149, 155). Ziegler et al. (205) spekulier-

ten über eine Bedeutung eines wohl sekundären NK-Defektes bei CLL Patienten für die gehäufte Entstehung sekundärer Neoplasien bei CLL - Patienten.

Die gezielte Selektion NK-resistenter Tumorzellen unter dem Selektionsdruck von NK-Zellen in-vivo oder in-vitro führt zu einem erhöhten Metastasierungspotential (42, 51) bzw. einer erhöhten Tumorigenität (27, 88). Bei einer ungezielten Auswahl von Tumorsublinien ergibt sich allerdings keine Korrelation zwischen NK-Suszeptibilität und Metastasierungsneigung (51). Für die Fähigkeit, Metastasen zu setzen, sind also auch andere Zelleigenschaften von Bedeutung. Ebenso fanden Hanna und Fidler (51) keinen systematischen Zusammenhang zwischen dem Metastasierungspotential von Zelllinien aus Spontanmetastasen und deren NK-Resistenz. Andere dagegen berichten, daß Tumorzellen aus Metastasen NK-resistenter sind als Zellen aus dem Ausgangstumor (17, 43). Nach Brooks et al. (17) verliert sich diese Resistenz allerdings nach kurzem Wachstum unter Zellkulturbedingungen, was die Diskrepanz zu den Daten von Hanna und Fidler erklären könnte.

4.6.2. Hinweise auf therapeutische Relevanz

Die inzwischen in großer Menge vorliegenden Daten (s. 4.6.1.) weisen in ihrer Gesamtheit auf eine wichtige Rolle natürlicher Resistenzmechanismen in der Auseinandersetzung zwischen Tumor und Tumorträger hin. Unter diesem Gesichtspunkt haben die in dieser Arbeit von uns präsentierten Daten nicht nur im Hinblick auf den Zusammenhang zwischen Erkennung von Targetstrukturen und Lyse von frischen Leukämie-Zellen Bedeutung.

Mehr indirekte Hinweise auf eine Rolle des NK-Systems in humanen Tumorsystemen wurden bereits erwähnt. Weiterhin kann-

ten in mindestens zwei menschlichen Tumorsystemen eine durch IFN steigerbare Reaktivität gegen den eigenen Tumor nachgewiesen werden (2, 134). Obwohl in den meisten erwähnten Berichten die NK-Zellen für die Eindämmung der metastatischen Ausbreitung von Tumoren verantwortlich gemacht werden, gibt es auch sehr interessante Indizien für eine induzierbare lokal-therapeutische Rolle von NK-Zellen beim Menschen (188). Bei 10 von 12 Lungenkrebspatienten mit karzinomatösem Pleuraexsudat konnte durch intrapleurale Injektion von OK 432, einem lyophilisierten Streptokokkenpulver, das Pleuraexsudat oder die Tumorzellen im Exsudat wesentlich reduziert werden. Parallel dazu stieg die vorher reduzierte NK-Aktivität im Exsudat an und adherente Exsudatzellen verloren ihre Fähigkeit, die NK-Zellaktivität und deren Steigerung durch Interferon zu unterdrücken. Uchida und Micksche schließen daraus, daß der therapeutische Effekt auf einer Aktivierung der residenten NK-Zellen beruht. Die Beobachtung, daß NK-Zellen therapeutisch wirksam eingesetzt werden können und die hier vorgestellten Ergebnisse, die zusammen mit den Ergebnissen anderer (27, 74, 100) zeigen, daß die NK-Resistenz von Tumorzellen durch Cytostatika vermindert werden kann, lassen es für möglich erscheinen, daß einige Cytostatika ihre antikanzerogene Wirkung partiell über eine Resistenzminderung der Tumorzellen gegen NK-Zellen ausüben.

Bei der Therapie von Tumoren ist aus einem in-vitro gemessenen Effekt der Tumorreduktion nur dann auf eine in-vivo Bedeutung zu schließen, wenn die therapeutischen Maßnahmen nicht nur die Tumormasse reduzieren, sondern auch die proliferierende Zellfraktion. Beran et al. (12) zeigten, daß allogene NK-Zellen das Koloniewachstum von frischen AL-Blasten deutlich reduzieren können. Die dabei gemessene geringe in-vitro Lyse der AL-Blasten scheint also einer Reduktion der entscheidenden Zellfraktion zu entsprechen. Eine Sensitivierung der Leukämie-Zellen gegen NK-Zellen erscheint da-

her therapeutisch durchaus sinnvoll. Durch Aktivierung der Effektorzellen mit IFN konnte dieser Effekt verstärkt werden, während IFN-Behandlung der Leukämie-Zellen der Wirkung der NK-Zellen entgegen wirkte. Schon Trinchieri und Santoli (187) hatten gefunden, daß Actinomycin D den protektiven Effekt von IFN auf NK-Targetzellen aufheben kann. Ob es sich dabei allerdings um eine direkte Verhinderung der IFN-Wirkung oder um einen antagonistischen Effekt mit einem anderen Angriffspunkt handelt, blieb unklar. Da NK-Zellen auch das gesunde autologe Knochenmarkwachstum hemmen können (52), liegt hier allerdings auch eine mögliche Begrenzung des Systems und vielleicht sogar eine Mitursache für die knochenmarktoxische Wirkung vieler Cytostatika. In zwei uns bekannten in-vivo Studien konnte ein Synergismus von zytostatischer Therapie und NK-Mechanismen gezeigt werden. Kedar et al. injizierten lymphoide Zellkulturen mit NK-Aktivität in Mäuse mit implantierten schon disseminierten Mammakarzinomen. Tiere, die mit Cyclophosphamid und NK-aktiven Zellen behandelt worden waren, hatten eine 20% längere Überlebenszeit als Tiere, die nur Cyclophosphamid erhalten hatten. Allerdings starben in beiden Gruppen gleich viele Tiere an ihren Tumoren (90). Jorio et al. (82) untersuchten das Zusammenwirken von Hybridresistenz und Zytostase mit DTIC. Die Resistenz von F_1 -Hybriden bestimmter Mausstämmen gegen reinerbiges parentales Knochenmark (Hybrid-Resistenz) wird wahrscheinlich durch NK-Zellen oder sehr ähnliche Zellen bewirkt (28, 91, 104). Letai bestrahlte C57BL6 (B6) und (C57BL6 x DBA/2) F_1 -Mäuse erhielten B6 syngene EL-4 Lymphomzellen i.v. und einen Tag später DTIC i.p.. Bei jungen Mäusen (mit starker Hybrid-Resistenz und hoher NK-Aktivität) zeigte sich ein überadditiver Effekt von DTIC-Behandlung und Hybrid-Resistenz: Der Unterschied des Tumorstwachstums in Milz und Lunge und Leber zwischen tumorsyngenen B6 und Hybrid-resistenten F_1 -Mäusen war bei mit optimalen Dosen DTIC behandelten Tieren wesentlich höher, als bei Tieren,

die kein DTIC oder zu hohe Dosen erhalten hatten. Zu hohe DTIC-Dosen brachten den Unterschied zwischen syngenen und F_1 -Mäusen zum Verschwinden, vermutlich durch eine Unterdrückung des Hybrid-Resistenz-Mechanismus. Bei alten Mäusen mit geringer Hybrid-Resistenz (und geringer NK-Aktivität) zeigten DTIC und Hybrid-Resistenz nur einen additiven Effekt auf Milzmetastasen. Lungen- und Lebermetastasen waren bei alten Tieren in beiden Gruppen gleich häufig. Die DTIC-Dosen, bei denen sich der deutlichste Unterschied zwischen Tumorwachstum in F_1 - und B6-Mäusen ergab, führten auch insgesamt zur besten Hemmung des Tumorwachstums im ausgetesteten Dosisbereich. Zwar ist hier keine Aussage über den Wirkungsmechanismus des Cytostatikums auf die Wechselwirkung zwischen Tumorzellen und den natürlichen Abwehrmechanismen möglich, doch wurde hier überzeugend gezeigt, daß cytostatische Therapie nicht unbedingt negativ auf die an der Tumorabwehr beteiligten Immunmechanismen wirken muß, sondern mit diesem auch kooperieren kann. Von der Auswahl entsprechender Cytostatika, die in einem noch nicht immunsuppressiven Dosisbereich synergistisch mit dem Immunsystem zu einer genügenden Tumorreduktion führen, wäre eine Reduktion der Substanzbelastung, der Nebenwirkungen und möglicher sekundär-kanzerogener Wirkungen zu erwarten. Ob sich diese Hoffnung als realistisch erweist, werden zukünftige Untersuchungen und letztlich der klinische Alltag beweisen müssen. Schon so manches theoretisch hoffnungsvolle Konzept wurde hier den Erfordernissen der Realität nicht gerecht.

5. Zusammenfassung/Abstract

Mononukleäre Blutzellen (PBM) normaler Spender besitzen die Fähigkeit, Tumorzelllinien und frische Tumorzellen insbesondere hämopoetischer und lymphatischer Herkunft zu lysieren. Diese Funktion wird der distinkten Zellpopulation der natürlichen Killer (NK)-Zellen zugeschrieben und läßt sich durch Vorinkubation der PBM mit Interferon (IFN) steigern.

Acht frisch isolierte und/oder cryopräservierte, nicht an Zellkulturbedingungen adaptierte humane akute Leukämie-Zellen (LBC) wurden mit Actinomycin D (Act D) vorinkubiert und als Targetzellen im 5 1/2 h Chrom-Freisetzungstest mit allogenen PBM als Effektorzellen getestet. Die Lyse von vier der getesteten LBC ließ sich durch Act D steigern. Durch Aktivierung der Effektorzellen mit IFN ließ sich die Lyse der unbehandelten als auch der Act D-behandelten LBC weiter verbessern. Die Sensibilisierung der LBC benötigt eine Vorinkubation mit Act D von nur 4 h und erfolgt in einem umschriebenen Dosisbereich von 0,1-1,0 µg/ml. Allogene PBM, PHA-Blasten und die etablierten NK-Standard-Targetzelllinien K 562 und Molt 4 werden unter diesen Bedingungen nicht gegen die Lyse durch IFN-aktivierte PBM sensibilisiert. K 562 und Molt 4, nicht aber die NK-resistente Zelllinie P 815 hemmen die Lyse der LBC im Cold-Target-Inhibition-Test (CTI). Act D-behandelte und unbehandelte unmarkierte LBC hemmen die Lyse markierter LBC im gleichen Ausmaß.

Der Angriffspunkt der Act D-Wirkung im lytischen Ablauf liegt daher in einem Schritt nach der Targetbindung. Die Effektorzellen gegen LBC sind am wahrscheinlichsten NK-Zellen. Die Evidenz für die Bedeutung der NK-Zellen bei der Immunsurveillance und der Eindämmung malignen Wachstums wird referiert und die möglichen therapeutischen Implikationen der hier berichteten Ergebnisse werden diskutiert.

6. Liste der verwendeten Abkürzungen

*	Zellen, die nach Cryopräservation in flüssigem Stickstoff (siehe 2.2.3.) als Target- oder Effektorzellen verwendet wurden, sind mit * gekennzeichnet
Δ -asGM1	anti-asialo GM1, absorbiertes Kaninchenantiserum spezifisch für das Gangliosid asialo GM1
Act D	Actinomycin D (siehe 2.1.)
- Act D	ohne Act D vorinkubierte Targetzellen
+ Act D	mit Act D vorinkubierte Targetzellen
ADCC	(antibody-dependent, cellular cytotoxicity)
AL	akute Leukämie
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AMML	akute myelo-monozytäre Leukämie
anti Thy-1	Antiserum gegen den Maus-T-Zell-Marker Thy-1
AUL	akute undifferenzierte (non B-non T-)Leukämie
bg/bg, +/-bg	homozygot bzw. heterozygot für das "beige"-Gen
C'	Complement
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CML(-BC)	chronisch myeloische Leukämie im Blastenschub
CRA	(chromium release assay), ⁵¹ Chrom-Freisetzungs-Test (siehe 2.2.6.)
CTI	Cold-Target-Inhibition Assay (siehe 2.2.7.)
CTL	cytotoxische T-Lymphozyten
CY	Cyclophosphamid
E	experimentelle Chrom-Freisetzung = gesamte Chrom-Freisetzung pro Well in Anwesenheit einer gegebenen Zahl von Effektorzellen; Mittelwert dreier Messungen (s. 2.2.6.4.)
E:T	Effektor-zu-Target-Verhältnis
FcR	Rezeptor für den konstanten Teil (= Fc) von IgG
FU	Ficoll-Urovison (siehe 2.1.)
H2	H2 ist der Haupthistokompatibilitätskomplex der Maus

HLA	(human leucocyte antigen), HLA steht für den Haupthistokompatibilitätskomplex des Menschen
IFN	Interferon; wir verwendeten humanes Fibroblasten (β-)Interferon (siehe 2.1.)
-IFN	Effektorzellen, die ohne IFN vorinkubiert worden sind
+IFN	Effektorzellen, die mit IFN aktiviert worden sind (2.2.5.)
i.p.	intraperitoneal
I:T	Inhibitor-zu-Target-Verhältnis
i.v.	intravenös
ivCA	<u>in-vivo</u> Clearance Assay (siehe 4.6.1.)
KM	Knochenmark
LBC	leukämische (mononukleäre) Blutzellen
LGL	(large granular lymphocytes), große granuläre Lymphozyten
LU	(lytic unit), lytische Einheit = Zahl der Effektorzellen, die nötig sind, um aus einer gegebenen Zahl von Targetzellen eine festgesetzte SR zu bewirken; z.B. LU ₄₀ : SR = 40
M	maximale Chrom-Freisetzung = gesamte aus den Targetzellen freisetzbare Chrommenge bzw. Chrominkorporation der Targetzellen pro Well; Mittelwert aus sechs Messungen (s. 2.2.6.4.)
MHC	(major histocompatibility complex), Haupthistokompatibilitäts-Komplex
N ₂	flüssiger Stickstoff
NK	natürliche Killer (-Zellen, -Aktivität, etc.)
nu/nu, +/nu	homozygot bzw. heterozygot für das rezessive "nude"-Gen nackter Mäuse
PBM	(peripheral blood mononuclear cells), mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	(phosphate buffered saline), Phosphat-gepufferte isotone Salzlösung (siehe 2.1.)
PHA	Phytohämagglutinin P
poly I:C	Polyinositol-polycytidyl-Säure

- S spontane Chrom-Freisetzung aus den Targetzellen pro Well in Abwesenheit von Effektorzellen: Mittelwert aus sechs Messungen (siehe 2.2.6.4.)
- SR (specific release), spezifische Chrom-Freisetzung durch Effektorzellen, bezogen auf die gesamte spezifisch freisetzbare Chrominkorporation (siehe 2.2.6.4.).

7. Literaturverzeichnis

Liste der verwendeten Abkürzungen für Periodika:

Cancer Immunol. Immunother.	= Cancer Immunology and Immunotherapy
Clin. Exp. Immunol.	= Clinical and Experimental Immunology
Eur. J. Immunol.	= European Journal of Immunology
Int. J. Cancer	= International Journal of Cancer
J. exp. Med.	= Journal of experimental Medicine
J. Immunol.	= Journal of Immunology
J. Natl. Cancer Inst.	= Journal of the National Cancer Institute
Natl. Cancer Inst. Monogr.	= National Cancer Institute Monographs
Proc. Amer. Ass. Cancer Res.	= Proceedings of the American Association for Cancer Research
Proc. Natl. Acad. Sci.	= Proceedings of the National Academy of Sciences, USA
Scand. J. Immunol.	= Scandinavian Journal of Immunology

1. Adams, D.O., Nathan, C.F. (1983): Molecular mechanisms in tumor-cell killing by activated macrophages; *Immunology today*, 4, 166
2. Allavena, P., Introna, M., Sessa, C., Magioni, C., Mantovani, A. (1982): Interferon effect on cytotoxicity of peripheral blood and tumor-associated lymphocytes against human ovarian carcinoma cells; *J. Natl. Cancer Inst.*, 68, 555
3. Ashwood-Smith, M.J. (1961): Viability of mouse bone marrow frozen to -79°C in the presence of dimethyl sulfoxide; *Journal of Physiology*, 155, 26 P
4. Ashwood-Smith, M.J. (1961): Preservation of mouse bone marrow at -79°C with dimethyl sulfoxide; *Nature*, 190, 1204
5. Ashwood-Smith, M.J. (1964): Low temperature preservation of mouse lymphocytes with dimethyl sulfoxide; *Blood*, 23, 494
6. Ashwood-Smith, M.J. (1975): Current topics concerning radioprotective and cryoprotective properties of dimethyl sulfoxide in cellular systems; *Annals of the New York Academy of Science*, 243, 246
7. Babior, B.M., Parkinson, D.W. (1982): The NK cell: a phagocyte in lymphocytes' clothing? *Nature*, 298, 511
8. Baldwin, R.W. (1977): Immune surveillance revisited; *Nature*, 270, 557
9. Balkwill, F.R., Oliver, R.T.D. (1977): Growth inhibitory effects of interferon on normal and malignant human haematopoietic cells; *Int. J. Cancer*, 20, 500
10. Barlozzari, T., Reynolds, C.W., Herberman, R.B. (1983): *In-vivo* role of natural killer cells: involvement of large granular lymphocytes in the clearance of tumor cells in anti-asialo GM_1 -treated rats; *J. Immunol.*, 131, 1024

11. Bean, M.A., Miller, R.A., Kodera, Y., Herr, H.W. (1978):
Function of cryopreserved human effector cells in
antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity;
Natl. Cancer Inst. Monogr., 49, 93
12. Beran, M., Hansson, M., Kiessling, R. (1983): Human natural
killer cells can inhibit clonogenic growth of fresh
leukemic cells;
Blood, 61, 596
13. Bloom, B.R. (1982): Natural killer cells to rescue immune
surveillance?
Nature, 300, 214
14. Bloom, B.R., David, J.R. (Eds.) (1976): In-vitro methods
in cell-mediated and tumor immunity;
Academic Press, New York, San Francisco, London
15. Böyum (1968): Separation of lymphocytes from blood and bone
marrow;
Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory
Investigation, 21 (Supplement 97), 77
16. Bradley, T.P., Bonavida, (1982): Mechanism of cell-mediated
cytotoxicity at the single cell level: IV. Natural
killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity
can be mediated by the same human effector cell as de-
termined by the two-target conjugate assay;
J. Immunol. 129, 2260
17. Brooks, C.G., Flannery, G.R., Willmott, N., Austin, E.B.,
Kenwrick, S., Baldwin, R.W. (1981): Tumor cells in
metastatic deposits with altered sensitivity to natural
killer cells;
Int. J. Cancer, 28, 191
18. Brunner, T.K., Engers, H.D., Cerottini, J.C. (1976):
The ⁵¹Cr release assay as used for the quantitative
measurement of cell-mediated cytotoxicity in-vitro;
in 14, S. 423

19. Brunner, K.T., Mael, J., Cerottini, J.C., Chapius, B.
(1968): Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ^{51}Cr -labelled allogeneic target cells in-vitro; Inhibition by isoantibody and by drugs;
Immunology, 14, 181
20. Burnet, M. (1965): Somatic mutation and chronic disease;
British medical Journal, 2, 338
21. Burnet, M. (1970): Immunological Surveillance;
Pergamon Press, Oxford, London, New York, Toronto, Sidney
22. Callewaert, D.M., Kaplan, J., Peterson, W.D., Lightbody, J.J.
(1977): Spontaneous cytotoxicity of human lymphoblast cell lines mediated by normal peripheral blood lymphocytes. I. Differential susceptibility of T- versus B-cell lines;
Cellular Immunology, 33, 11
23. Carpen, O., Virtanen, J., Saksela, E. (1982): Ultrastructure of human natural killer-cells: nature of the cytolytic contacts in relation to cellular secretion;
J. Immunol., 128, 2691
24. Chapius, B., Summersgill, B.M., Cocks, P., Howard, P., Lawler, S.D., Alexander, P., Powles, R. (1977): Test for cryopreservation efficiency of human acute myelogenous leukaemia cells relevant to clinical requirements;
Cryobiology, 14, 637
25. Chernyakhovskaya, J.Y., Slavina, E.G., Svet-Moldavsky, G.J.
(1970): Antitumor effect of lymphoid cells activated by interferon;
Nature, 228, 71
26. Clark, E.A., Sturge, J.C., Falk, L.A. Jr. (1981): Induction of target antigens and conversion to susceptible phenotype of NK-cell-resistant lymphoid cell line;
Int. J. Cancer, 28, 647
27. Collins, J.L., Patek, P.Q., Cohn, M. (1981): Tumorigenicity and lysis by natural killers;
J. exp. Med., 153, 89

28. Cudkowicz, G., Hochman, P.S. (1970): Do natural killer cells engage in regulated reactions against self to ensure homeostasis?
in 117, S. 13
29. Dennert, G. (1980): Cloned lines of natural killer cells;
Nature, 287, 47
30. Doebller, G.F., Rowe, A.W., Rinfret, A.P. (1966): Freezing of mammalian blood and its constituents;
in 113, S. 407
31. Dunn, T.B., Potter, M. (1957): A transplantable mast cell-neoplasm in the mouse;
J. Natl. Cancer Inst., 18, 587
32. Ehrlich, R., Efrati, M., Malatzky, E., Shochat, L., Bar Eyal, A., Witz, I.P. (1983): Natural host defence during oncogenesis. NK activity and dimethylbenzanthracene carcinogenesis;
Int. J. Cancer, 31, 67
33. Erhardt, J., Emmerich, B., Theml, H., Riethmüller, G., Ziegler-Heitbrock, H.W.L. (1983): Enhancement of the cell-mediated lysis of fresh human leukemia cells by cytostatic drugs;
in 120, S. 76
34. Farrant, J., Knight, S. (1978): Lymphocyte conservation;
in: Rainer, H., Borberg, H., Mishler, J.M., Schäfer, U. (1978): Cell-separation and cryobiology;
Schattauer Verlag, Stuttgart, New York, S. 220
35. Foreman, J., Pegg, D.E. (1979): Cell preservation in a programmed colling machine: the effect of variations in supercooling;
Cryobiology, 16, 315
36. Gabrilovac, J., Boranić, M., Radačić, M. (1976): Cr-releasing cytotoxicity tests: study of parameters influencing their reliability;
Zeitschrift für Immunitätsforschung, 151, 3

37. Gidlund, M., Nilsson, K., Tötterman, T., Wigzell, H.
(1982): Natural killer cells and their targets:
impact of differentiation on target cell susceptibility;
in 120, S. 466
38. Gidlund, M., Örn, A., Pattengale, P.K., Jansson, M.,
Wigzell, H., Nilsson, K. (1981): Natural killer cells
kill tumour cells at a given stage of differentiation;
Nature, 292, 848
39. Glimcher, L., Shen, F.W., Cantor, H. (1977): Identification
of a cell-surface antigen selectively expressed on the
natural killer cell;
J. exp. Med., 145, 1
40. Golub, S.H. (1976): Cryopreservation of human lymphocytes;
in 14, S. 731
41. Golub, S.H., Sulit, H.L., Morton, D.L. (1975): The use of
viable frozen lymphocytes for studies in human tumor
immunology;
Transplantation, 19, 195
42. Gorelik, E., Feldman, M., Segal, S. (1982): Selection of
3LL tumor subline resistant to natural effector cells
concomittantly selected for increased metastatic potency;
Cancer Immunol. Immunother., 12, 105
43. Gorelik, E., Fogel, M., Feldman, M., Segal, S. (1979):
Difference in resistance of metastatic tumor cells and
cells from local tumor growth to cytotoxicity of natural
killer cells;
J. Natl. Cancer Inst., 63, 1397
44. Gorelik, E., Wiltrout, R.H., Brunda, M.J., Holden, H.T.,
Herberman, R.B. (1982): Augmentation of metastasis
formation by thioglycollate-elicited macrophages;
Int. J. Cancer, 29, 575
45. Gorelik, E., Wiltrout, R.H., Okumura, K., Habu, S.,
Herberman, R.B. (1982): Role of NK-cells in the control
of metastasis spread and growth of tumor cells in mice;
Int. J. Cancer, 30, 107

46. Gresser, I. (1977): Antitumor effects of interferon;
in: Becker, F.F. (1977): Cancer: a concise treatise,
Vol. 5; Plenum Press, New York, London, 1977, S. 511
47. Grönberg, A., Kiessling, R., Eriksson, E., Hansson, M.
(1981): Variants from a MLV-induced lymphoma selected
for decreased sensitivity to NK-lysis;
J. Immunol., 127, 1734
48. Gupta, S., Fernandes, G., Nair, M., Good, R.A. (1978):
Spontaneous and antibody-dependent cell-mediated cyto-
toxicity by human T-cell subpopulations;
Proc. Natl. Acad. Sci., 75, 5137
49. Haller, O., Hansson, M., Kiessling, R., Wigzell, H.
(1977): Role of non-conventional natural killer cells
in resistance against syngeneic tumor cells in vivo;
Nature, 270, 609
50. Hanna, N., Burton, R.C. (1981): Definitive evidence that
natural killer (NK) cells inhibit experimental tumor
metastasis in vivo;
J. Immunol., 127, 1754
51. Hanna, N., Fidler, I.J. (1981): Relationship between meta-
static potential and resistance to natural killer cell-
mediated cytotoxicity in three murine tumor systems;
J. Natl. Cancer Inst., 66, 1183
52. Hansson, M., Beran, M., Andersson, B., Kiessling, R. (1982):
Inhibition of in vitro granulopoiesis by autologous and
allogeneic human NK cells;
J. Immunol., 129, 126
53. Hansson, M., Kärre, K., Kiessling, R., Roder, J., Andersson, B.,
Häyry, P. (1979): Natural NK-cell targets in the mouse
thymus: characteristics of the sensitive cell population;
J. Immunol., 123, 765
54. Hansson, M., Kiessling, R., Andersson, B. (1981): Human
fetal thymus and bone marrow contain target cells for
natural killer cells;
Eur. J. Immunol., 11, 8
55. Hansson, M., Kiessling, R., Andersson, B., Kärre, K., Roder, J.:
(1979): Natural killer cell (NK) sensitive T cell subpopu-
lations in the thymus: inverse correlation to NK activity
of the host;
Nature, 278, 174

57. Hellström, J. (1967): A colony inhibition (CJ) technique for demonstration of tumor cell destruction by lymphoid cells in vitro;
Int. J. Cancer, 2, 65
58. Hellström, I., Hellström, K.E., Sjögren, H.O., Warner, G.M. (1971): Demonstration of cell-mediated immunity to human neoplasmas of various histological types;
Int. J. Cancer, 7, 1
59. Henney, C.S., Kuribayashi, K., Kern, D., Gillis, S. (1981): Interleukin-2 augments natural killer cell activity;
Nature, 291, 335
60. Herberman, R.B. (Ed.) (1980): Natural cell-mediated immunity against tumors;
Academic Press, New York, London, Toronto, Sidney, San Francisco(direkte Zitate dieses Titels beziehen sich auf die Summaries des Herausgebers am Ende jedes Abschnitts)
61. Herberman, R.B., Djeu, J.Y., Kay, H.D., Ortaldo, J.R., Riccardi, C., Bonnard, G.O., Holden, H.T., Fagnani, R., Santoni, A., Pucetti, P. (1979): Natural killer cells: characteristics and regulation of activity;
in 117, S. 43
62. Herberman, R.B., Gaylord, C.E. (Eds.) (1973): Conference and workshop on cellular immune reactions to human tumor-associated antigens;
Natl. Cancer Inst. Monogr., 37
63. Herberman, R.B., Holden, H.T. (1978): Natural cell-mediated immunity;
Advances in cancer research, 27, 305
64. Herberman, R.B., Nunn, M.E., Holden, H.T. (1976): Cytotoxicity inhibition assay for analysis of specificity of cell-mediated 51-Cr release cytotoxicity;
in 14, S. 489

65. Herberman, R.B., Nunn, M.E., Lavrin, D.H. (1975):
Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells
against syngeneic and allogeneic tumors: I. Distribution
reactivity and specificity;
Int. J. Cancer, 16, 216
66. Herberman, R.B., Oldham, R.K. (1975): Problems associated
with study of cell-mediated immunity to human tumors
by microcytotoxicity assays;
J. Natl. Cancer Inst., 55, 749
67. Herberman, R.B., Oldham, R.K., Connor, R.J. (1976):
Statistical analysis and selection of baseline controls
in cytotoxicity assays;
in 14, S. 481
68. Herberman, R.B., Ortaldo, J.R. (1981): Natural killer cells:
their role in defense against disease;
Science, 214, 24
69. Hiserodt, J.C., Britvan, L.J., Targan, S.R. (1982):
Characterisation of the cytolytic reaction mechanism
of the human natural killer (NK) lymphocyte: resolution
into binding, programming, and killer cell-independent
steps;
J. Immunol., 129, 1782
70. Hiserodt, J.C., Britvan, L.J., Targan, S.R. (1982):
Inhibition of human natural killing by heterologous
and monoclonal antibodies;
J. Immunol., 129, 2248
71. Hiserodt, J.C., Britvan, L.J., Targan, S.R. (1982):
Differential effects of various pharmacologic agents
on the cytolytic reaction mechanism of the human
natural killer lymphocyte: further resolution of pro-
gramming for lysis and KCIL into discrete stages;
J. Immunol., 129, 2266
72. Hoffman, T., Hirata, F., Bougnoux, P., Fraser, B.A.,
Goldfarb, R.H., Herberman, R.B., Axelrod, J. (1981):
Phospholipid methylation and phospholipase A₂ activation
in cytotoxicity by human natural killer cells.
Proc. Natl. Acad. Sci., 78, 3839

73. Holden, H.T., Oldham, R.K., Ortaldo, J.R., Herberman, R.B.
(1976): Cryopreservation of the functional reactivity
of normal and immune leucocytes and of tumor cells;
in 14, S. 723
74. Hudig, D., Djobadze, M., Redelman, D., Mendelsohn, J.
(1981): Active tumor cell resistance to human natural
killer lymphocyte attack;
Cancer Research, 41, 2803
75. Hudig, D., Haverty, T., Fulcher, C., Redelman, D.,
Mendelsohn, J. (1981): Inhibition of natural killing
by macromolecular antiproteases;
J. Immunol., 126, 1569
76. Hyman, R.W., Davidson, N. (1971): The binding of
Actinomycin D to crab poly d (A-T)· poly d (T-A).
II. On the nature of the DNA binding site;
Biochemia et Biophysica Acta, 228, 38
77. Interferon nomenclature; (anonym) (1980);
Nature, 286, 110
78. Jewett, M.A. (1978): Cryopreservation of lymphocytes to
standardize in vitro immune functions;
Natl. Cancer Inst. Monogr., 49, 89
79. Jondal, M. (1976): Spontaneous lymphocyte-mediated cyto-
toxicity (SLMC) in vitro: assay for, and removal of, the
effector cell;
in 14, S. 263
80. Jondal, M., Pross, H. (1975): Surface markers on human
B- and T-lymphocytes. VI. Cytotoxicity against cell
lines as a functional marker for lymphocyte subpopu-
lations;
Int. J. Cancer, 15, 596
81. Jondal, M., Spina, C., Targan, S. (1978): Human spontaneous
killer cells selective for tumor-derived target cells;
Nature, 272, 62

82. Jorio, A.M., Neri, M., Enrico, P., Goldin, A., Bonmassar, E.
(1981): Combined effects of natural resistance and
chemotherapy against a murine lymphoma in lethally ir-
radiated mice;
Int. J. Cancer, 28, 497
83. Kadish, A.S., Tansey, F.A., Yu, G.S.M., Doyle, A.T.,
Bloom, B.R. (1980): Interferon as a mediator of human
lymphocyte suppression;
J. exp. Med., 151, 637
84. Kärre, K., Klein, G.O., Kiessling, R., Klein, G., Roder, J.C.
(1980): Low natural in vivo resistance to syngeneic
leukaemias in natural killer deficient mice;
Nature, 284, 624
85. Kaplan, J.G. (Ed.) (1979): The molecular basis of immune
cell function;
Elsevier/North-Holland Medical Press, Amsterdam,
New York, Oxford
86. Karpovitch, X.L., Rosenkovitch, E., Ben-Basset, H.,
Izak, G. (1980): Structure and functional alterations
in lymphocytes induced by cryopreservation;
Cryobiology, 17, 12
87. Kasai, M., Yoneda, T., Habu, S., Maruyama, Y., Okumura, K.,
Tokunaga, T. (1981): In vivo effect of anti-asialo GM1
antibody on natural killer activity;
Nature, 291, 334
88. Kawase, J., Urdal, D.L., Brooks, C.G., Henney, C.S. (1982):
Selective depletion of NK-cell activity in vivo and
its effect on the growth of NK-sensitive and NK-
resistant tumor cell variants;
Int. J. Cancer, 29, 567
89. Kay, H.D., Sinkovics, J.G. (1974): Cytotoxic lymphocytes
from normal donors;
Lancet, 2, 396
90. Kedar, E., Ikejiri, B.L., Gorelik, E., Herberman, R.B.
(1982): Natural cell-mediated cytotoxicity in vitro
by murine lymphoid cells cultured with T cell growth
factor (TCGF);
Cancer Immunol. Immunother., 13, 14

91. Kiessling, R., Hochman, P., Haller, O., Shearer, G.M., Wigzell, H., Cudkowicz, G. (1977): Evidence for a similar or common mechanism for natural killer cell activity and resistance to hemopoietic grafts; Eur. J. Immunol., 7, 655
92. Kiessling, R., Klein, E., Pross, H., Wigzell, H. (1975): "Natural" killer cells in the mouse: II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of killer cells; Eur. J. Immunol., 5, 117
93. Kiessling, R., Klein, E., Wigzell, H. (1975): "Natural" killer cells in the mouse: I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype; Eur. J. Immunol., 5, 112
94. Kiessling, R., Petranyi, G., Klein, G., Wigzell, H. (1975): Genetic variations of in vitro cytolytic activity and in vivo rejection potential of non-immune semi-syngeneic mice against a mouse lymphoma line; Int. J. Cancer, 15, 933
95. Kiuchi, M., Takasugi, M. (1976): The nonselective cytotoxic cell (N-cell); J. Natl. Cancer Inst., 56, 575
96. Klein, E. (1981): Interpretation and in vivo relevance of lymphocytotoxicity assays; in: Neth, R., Gallo, R.C., Graf, T., Mannweiler, K., Winkler, K. (1981): Modern Trends in Human Leukemia IV, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, S. 345
97. Klein, E. (1983): Naming in clonal terms; Immunology today 4, 97
98. Klein, E., Vanky, F. (1981): Natural and activated cytotoxic lymphocytes which act on autologous and allogeneic tumor cells; Cancer Immunol. Immunother., 11, 183

99. Knight, R.A., Fitzharris, P. (1980): Separation of spontaneous-killing effector populations by target preference;
British Journal of Cancer, 42, 243
100. Kunkel, L.A., Welsh, R.M. (1981): Metabolic inhibitors render "resistant" target cells sensitive to natural killer cell mediated lysis;
Int. J. Cancer, 27, 73
101. Lau, B., Jäger, G., Korge, E., Dörmer, P. (1983): K 562 cell line in plasma clot diffusion chambers: changes in cell surface phenotype in relation to culture conditions;
in 120, S. 394
102. Levy, N.L., Mahaley, M.S., Day, E.D. (1972): In vitro demonstration of cell-mediated immunity to human brain tumors;
Cancer Research, 32, 477
103. Lohmann-Matthes, M.-L., Domzig, W. (1979): NK-cell cytotoxicity is performed by promonocytes, which are isolated from mouse bone marrow cultures;
in 85, 588
104. Lotzová, E., Pollack, S.B. (1981): The first direct evidence on the involvement of natural killer cells in bone marrow graft rejection;
Experimental Haematology, 9 (Supplement No 9), 16, Abstr. 23
105. Lovelock, J.E., Bishop, M.W.H. (1959): Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulfoxide;
Nature, 183, 1394
106. Luzzio, C.B., Luzzio, B.B. (1973): Cytotoxicity of a factor isolated from human spleen;
J. Natl. Cancer Inst., 50, 535
107. Luzzio, C.B., Luzzio, B.B., Yang, W.K., Ichiki, A.T., Bamberger, E.G. (1976): Absence of thymus-derived lymphocyte markers in myelogenous leukemia (Ph¹⁺) cell line K 562;
Cancer Research, 36, 4657

108. Mailey, J.A., Nussbaum-Blumenson, A., Sheedy, D., Grossmayer, B.J., Ozer, H. (1982): Identification of the T cell subset that produces human γ -interferon; J. Immunol., 128, 2522
109. Margrath, J.T. (1981): Lymphocyte differentiation: an essential basis for the comprehension of lymphoid neoplasia; J. Natl. Cancer Inst., 67, 501
110. Marie, J.P., Izaguirre, G.A., Civin, C.J., Mirro, J., McCulloch, E.A. (1981): The presence within single K 562 cells of erythropoietic and granulopoietic differentiation markers; Cancer Research, 58, 708
111. McCoy, J.L., Herberman, R.B., Rosenberg, E.B., Donnelly, F.C., Levine, P.H., Alford, C. (1973): 51 Chromium-release assay for cell-mediated cytotoxicity of human leukemia and lymphoid tissue culture cells; in 62, S. 59
112. McKhann, C.F., Cleveland, R.H., Burk, M.W. (1973): Some problems involving in vitro cellular cytotoxicity assays; in 62, S. 37
113. Meryman, H.T. (Ed.) (1966): Cryobiology; Academic Press, London, New York
114. Meryman, H.T. (1966): Review of biological freezing; in 113
115. Minowada, J., Minato, K., Tatsumi, E., Sugimodo, T., Nakazawa, S., Ohnuma, T., Kuboniski, J., Miyoshi, J., Frankel, A., Gallo, R.C. (1983): A model scheme for human hematopoietic cell differentiation as determined by multiple markers of leukemia-lymphomas; in 120, S. 348

116. Minowada, J., Ohnuma, T., Moore, G.E. (1972): Rosette forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes; J. Natl. Cancer Inst., 49, 891
117. Möller, G. (Ed.) (1979): Immunological Reviews 44: Natural killer cells; Munksgaard, Copenhagen
118. Möller, G., Möller, E. (1975): Considerations of some concepts in cancer research; J. Natl. Cancer Inst., 55, 755
119. Moore, M., Taylor, G.M., White, W.J. (1982): Susceptibility of human leukemias to cell-mediated cytotoxicity by interferon-treated allogeneic lymphocytes; Cancer Immunol. Immunother., 13, 56
120. Neth, R., Gallo, R.C., Greaves, M.F., Moore, M.A.S., Winkler, K. (Eds.) (1982): Modern Trends in Human Leukemia V; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo
121. Newman, W. (1982): Selective blockade of human natural killer cells by a monoclonal antibody; Proc. Natl. Acad. Sci., 79, 3858
122. Nunn, M., Herberman, R.B. (1979): Natural cytotoxicity of mouse rat and human lymphocytes against heterologous target cells; J. Natl. Cancer Inst., 62, 765
123. Nunn, M., Herberman, R.B., Holden, H.T. (1977): Natural cell-mediated cytotoxicity in mice against non-lymphoid tumor cells and some normal cells; Int. J. Cancer, 20, 381
124. Obexer, G., Rumpold, H., Kraft, D. (1983): Target-effector-cell interactions in the human natural-killer (NK)-system: isolation of target structures; Immunobiology, 165, 15

125. Ojo, E., Wigzell, H. (1978): Natural killer cells may be the only cells in normal mouse lymphoid cell populations endowed with cytotoxic ability for antibody-coated tumor target cells;
Scand. J. Immunol., 7, 297
126. Oldham, R.K. (1974): Cryopreservation of human lymphocytes reactive in the ^{51}Cr cytotoxicity assay;
Proc. Amer. Ass. Cancer Res., 15, 95
127. Oldham, R.K., Dean, J.H., Cannon, G.B., Ortaldo, J.R., Dunston, G., Applebaum, F., McCoy, J.L., Djeu, J., Herberman, R.B. (1976): Cryopreservation of human lymphocyte function as measured by in vitro assays;
Int. J. Cancer, 18, 145
128. Oldham, R.K., Djeu, J.Y., Cannon, G.B., Siwarski, D., Herberman, R.B. (1975): Cellular microcytotoxicity in human tumor systems: analysis of results;
J. Natl. Cancer Inst., 55, 1305
129. Oldham, R.K., Siwarski, D., McCoy, J.L., Plata, E.J., Herberman, R.B. (1973): Evaluation of a cell-mediated cytotoxicity assay utilizing ^{125}I iododeoxyuridine-labeled tissue-culture target cells;
in 62, S. 49
130. Ono, A., Amos, D.B., Koren, H.S. (1977): Selective cellular natural killing against human leukemic T cells and thymus;
Nature, 266, 546
131. Ortaldo, J.R., Oldham, R.K., Cannon, G.C., Herberman, R.B. (1977): Specificity of natural cytotoxic reactivity of normal human lymphocytes against a myeloid cell line;
J. Natl. Cancer Inst., 59, 77
132. Ortaldo, J.R., Sharrow, S.O., Timonen, T., Herberman, R.B. (1981): Determination of surface antigens on highly purified human NK cells by flow cytometry with monoclonal antibodies.
J. Immunol., 127, 2401

133. Ortiz de Landazuri, M., Herberman, R.B. (1972): Specificity of cellular immune reactivity to virus-induced tumours; *Nature, New Biology*, 238, 18
134. Paciucci, P.A., Ohnuma, T., Alter, B.P., Lassus, M., Holland, J.F., Wasserman, L. (1982): Susceptibility of human tumor cells to lysis mediated by human natural killer (NK) cells; *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.*, 23, 268
135. Pape, G.R., Hadam, M.R., Eisenburg, J., Riethmüller, G. (1981): Natural killer cell activity during treatment with fibroblast interferon; *Immunobiology*, 158, 450
136. Patek, P.Q., Collins, J.L., Cohn, M. (1983): Evidence that cytotoxic T cells and natural cytotoxic cells use different lytic mechanisms to lyse the same target; *Eur. J. Immunol.*, 13, 433
137. Pattengale, P.K., Gidlund, M., Nilsson, K., Sundström, C., Örn, A., Wigzell, H. (1981): Lysis of human B-lymphocyte-derived lymphoma/leukemia cells of established cell lines by interferon-activated natural killer (NK) cells; *Int. J. Cancer*, 28, 459
138. Pattengale, P.K., Gidlund, M., Nilsson, K., Sundström, C., Sällström, J., Simonsson, B., Wigzell, H. (1982): Lysis of fresh human B-lymphocyte derived leukemia cells by interferon-activated natural killer (NK) cells; *Int. J. Cancer*, 29, 1
139. Peri, G., Polentarutti, N., Sessa, C., Mangioni, C., Mantovani, A. (1981): Tumoricidal activity of macrophages isolated from human ascitic and solid ovarian carcinomas: augmentation by interferon, lymphokines and endotoxin; *Int. j. Cancer*, 28, 143
140. Pollack, S.B., Hallenbeck, L.A. (1982): In vivo reduction of NK reactivity with anti-NK1 serum: direct evaluation of NK cells in tumor clearance; *Int. J. Cancer*, 29, 203

141. Pross, H.F., Baines, M.G. (1980): Characteristics of human natural killer cells;
in 60, S. 151
142. Pross, H.F., Baines, M.G., Rubin, P., Shragge, P., Patterson, M.S. (1981): Spontaneous human lymphocyte-mediated cytotoxicity against tumor target cells. IX. The quantitation of natural killer cell activity;
Journal of Clinical Immunology, 1, 51
143. Pross, H.F., Jondal, M. (1975): Cytotoxic lymphocytes from normal donors: a functional marker of human non T-lymphocytes;
Clin. Exp. Immunol. 21, 226
144. Reid, L., Minato, N., Gresser, I., Holland, J., Kadish, A., Bloom, B.R. (1981): Influence of anti-mouse interferon serum on the growth and metastasis of tumor cells persistently infected with virus and of human prostatic tumors in athymic nude mice;
Proc. Natl. Acad. Sci., 78, 1171
145. Riccardi, C., Santoni, A., Barlozzari, T., Herberman, R.B. (1980): Role of NK cells in rapid in vivo clearance of radiolabelled tumor cells;
in 60, S. 1121
146. Roder, J.C., Ahrlund-Richter, L., Jondal, M. (1979): Target-effector interaction in the human and murine natural killer system (Specificity and xenogeneic reactivity of the solubilized natural killer-target structure complex and its loss in a somatic cell hybrid);
J. exp. Med., 150, 471
147. Roder, J.C., Argov, S., Klein, M., Petersson, C., Kiessling, R., Andersson, K., Hansson, M. (1980): Target-effector cell interaction in the natural killer cell system. V. Energy requirements, membrane integrity, and the possible involvement of lysosomal enzymes;
Immunology, 40, 107

148. Roder, J.C., Duwe, A. (1979): The beige mutation in the mouse selectively impairs natural killer cell function;
Nature, 278, 451
149. Roder, J.C., Haliotis, T., Klein, M., Korec, S., Jett, J.R., Ortaldo, J., Herberman, R.B., Katz, P., Fauci, A.S. (1980): A new immunodeficiency disorder in humans involving NK cells;
Nature, 284, 553
150. Roder, J.C., Helfand, F.L., Werkmeister, J., McGarry, R., Beaumont, T.J., Duwe, A. (1982): Oxygen intermediates are triggered early in the cytolytic pathway of human NK cells;
Nature, 298, 569
151. Roder, J.C., Karre, K., Kiessling, R. (1981): Natural killer cells;
Progress in Allergy, 28, 66
152. Roder, J.C., Kiessling, R. (1978): Target-effector interaction in the natural killer cell system. I. Co-variance and genetic control of cytolytic and target-cell-binding subpopulations in the mouse;
Scand. J. Immunol., 8, 135
153. Roder, J.C., Kiessling, R., Biberfeld, P., Andersson, B. (1978): Target-effector interaction in the natural killer (NK) cell system. II. The isolation of NK-cells and studies on the mechanism of killing;
J. Immunol., 121, 2509
154. Roder, J.C., Rosen, A., Fenyö, E.M., Troy, F.A. (1979): Target-effector interaction in the natural killer cell system: isolation of target structures;
Proc. Natl. Acad. Sci., 76, 1405
155. Roder, J.C., Todd, R.F., Rubin, P., Haliotis, T., Helfand, S.L., Werkmeister, J., Pross, H.F., Boxer, L.A., Schlossmann, S.F. (1983): The Chediak-Higashi gene in the humans. III. Studies on the mechanism of NK impairment;
Clin. Exp. Immunol., 51, 359

156. Rosenberg, E.B., Herberman, R.B., Levine, P.H.,
Halterman, R.H., McCoy, J.L., Wunderlich, J.R. (1972):
Lymphocyte cytotoxicity reactions to leukemia associated
antigens in identical twins;
Int. J. Cancer, 9, 648
157. Rosenberg, E.B., McCoy, J.L., Green, S.S., Donnelly, F.C.,
Siwarski, D.F., Levine, P.H., Herberman, R.B. (1974):
Destruction of human lymphoid tissue-culture cell
lines by human peripheral lymphocytes in 51-Cr-release
cellular cytotoxicity assay;
J. Natl. Cancer Inst., 52, 345
158. Sanderson, A.R., Beverley, P.C.L. (1983): Interferon,
B-2-microglobulin and immunoselection in the pathway
to malignancy;
Immunology today, 4, 211
159. Santoli, D., Koprowski, H. (1979): Mechanism of
activation of human natural killer cells against
tumor and virus-infected cells;
in 117, S. 125
160. Schlager, S.I. (1982): Relationship between cell-
mediated and humoral immune attack on tumor cells;
Cellular Immunology, 66, 300
161. Schlager, S.I., Boyle, M.D.P., Ohanian, S.H., Boros, T.
(1977): Effect of inhibiting DNA, RNA, and protein
synthesis of tumor cells on their susceptibility to
killing by antibody and complement;
Cancer Research, 37, 1432
162. Schlager, S.I., Ohanian, S.H. (1979): A role for fatty
acid composition of complex cellular lipids in the
susceptibility of tumor cells to humoral immune
killing;
J. Immunol., 123, 146
163. Schlager, S.I., Ohanian, S.H. (1980): Tumor cell lipid
composition and sensitivity to humoral immune killing;
J. Immunol., 124, 626

164. Sendo, F., Aoki, T., Boyse, E.A., Buafo, C.K. (1975):
Natural occurrence of lymphocytes showing cytotoxic
activity to BALB/c radiation induced leukemia RLo1
cells;
J. Natl. Cancer Inst., 55, 603
165. Sinha, B.K., Chignell, C.F. (1979): Interaction of
antitumor drugs with human erythrocyte ghost membranes
and mastocytoma P 815: A spin label-study;
Biochemical and Biophysical Research Communication,
86, 1051
166. Sinha, B.K., Cox, G.M. (1980): Stimulation of superoxide
formation by Actinomycin D and its N²-substituted spin-
labelled derivatives;
Molecular Pharmacology, 17, 432
167. Sinkovics, J.G., Tebbi, K., Cabiness, J.R. (1973):
Cytotoxicity of lymphocytes to established cultures
of human tumors: evidence for specificity;
in 62, S. 9
168. Skurzak, H., Steiner, L., Klein, E., Lamon, E. (1973):
Cytotoxicity of human peripheral lymphocytes for
glioma, osteosarkoma, and glia cells;
in 62, S. 93
169. Sobell, H.M. (1974): How Actinomycin D binds to DNA;
Scientific American, 231, No 8, 82
170. Strong, D.M., Ortaldo, J.R., Pandolfi, F. (1981):
Differential recoverage of K and NK cell function
following cryopreservation of human mononuclear cells;
Cryobiology, 18, 623
171. Stutman, O. (1975): Delayed tumor appearance and ab-
sence of regression in nude mice infected with
murine sarcoma virus;
Nature, 253, 142
172. Stutman, O. (1978): Spontaneous, viral, and chemically
induced tumors in the nude mouse;
in: Fogh, J., Giovanella, B.C. (1978): The nude mouse
in experimental and clinical research;
Academic Press, New York, San Francisco, London, S. 411

173. Stutman, O. (1981): NK cells, anti-tumor surveillance and interleukins;
Immunology today, 2, 205
174. Svet-Moldavsky, G.J., Chernyakhovskaya, J.Y. (1967):
Interferon and the interaction of allogeneic normal and immune lymphocytes with L-cells;
Nature, 215, 1299
175. Tai, A.S., Safilian, B., Warner, N.L. (1982): Identification of distinct target-specific subsets of NK cells in peripheral blood of normal donors;
Human Immunology, 4, 123
176. Takasugi, M., Klein, E. (1970): A microassay for cell-mediated immunity;
Transplantation, 9, 219
177. Takasugi, M., Mickey, M.R., Terasaki, P.I. (1973): Reactivity of lymphocytes from normal persons on cultured tumor cells;
Cancer Research, 33, 2898
178. Takasugi, M., Mickey, M.R., Terasaki, P.I. (1973): Quantitation of the microassay for cell-mediated immunity through electronic image analysis;
in 62, S. 77
179. Takasugi, M., Mickey, M.R., Terasaki, P.I. (1974): Studies on specificity of cell-mediated immunity to human tumors.
J. Natl. Cancer Inst., 53, 1527
180. Takasugi, M., Ward, P.H., Mickey, M.R., Terasaki, P.I. (1972): Allogeneic cell-mediated testing for human tumor antigens;
Natl. Cancer Inst.Monogr., 35, 251
181. Talmadge, J.E., Meyers, K.M., Prieur, D.J., Starkey, J.R. (1980): Role of NK cells in tumor growth and metastasis in beige mice;
Nature, 284, 622

182. Tamm, I., Sehgal, P.B. (1979): Interferons;
American Journal of Medicine, 66, 3
183. Thomas, L. (1959): S. 529-532 in: Lawrence, H.S. (1959):
Cellular and humoral aspects of hypersensitivity;
Cassell, London
184. Timonen, T., Ortaldo, J.R., Herberman, R.B. (1981):
Characteristics of human large granular lymphocytes
and relationship to natural killer and K cells;
J. exp. Med., 153, 569
185. Timonen, T., Ortaldo, J.R., Herberman, R.B. (1982):
Analysis by a single cell cytotoxicity assay of
natural killer (NK) cell frequencies among human
large granular lymphocytes and of the effect of
interferon on their activity;
J. Immunol., 128, 2514
186. Timonen, T., Saksela, E., Virtanen, J., Cantell, K.
(1980): Natural killer cells are responsible for
the interferon production induced in human lympho-
cytes by tumor cell contact;
Eur. J. Immunol., 10, 422
187. Trinchieri, G., Santoli, D. (1978): Antiviral activity
induced by culturing lymphocytes with tumor-derived
or virus-transformed cells: enhancement of human
natural killer activity by interferon and antagonistic
inhibition of susceptibility to target cell lysis;
J. exp. Med., 147, 1314
188. Uchida, A., Micksche, M. (1983): Intrapleural ad-
ministration of OK 432 in cancer patients: activation
of NK cells and reduction of suppressor cells;
Int. J. Cancer 31, 1
189. Ullberg, M., Merrill, J., Jondal, M. (1981): Interferon-
induced NK-augmentation in humans: an analysis of
target cell recognition, effector cell recruitment
and effector cell recycling;
Scand. J. Immunol., 14, 285

190. Vanky, F.T., Argov, S.A., Einhorn, S.A., Klein, E.
(1980): Role of alloantigens in natural killing.
Allogeneic but not autologous tumor biopsy cells
are sensitive for interferon-induced cytotoxicity
of human blood lymphocytes;
J. exp. Med., 151, 1151
191. Vanky, F., Klein, E. (1982): Specificity of auto-tumor
cytotoxicity exerted by fresh, activated and pro-
pagated human T-lymphocytes;
Int. J. Cancer, 29, 547
192. Vodinelich, L., Sutherland, R., Schneider, C., Neuman, R.,
Greaves, M. (1983): Receptor for transferrin may be a
"target" structure for natural killer cells;
Proc. Natl. Acad. Sci., 80, 835
193. Warner, J.F., Dennert, G. (1982): Effects of a cloned
cell line with NK activity on bone marrow transplants,
tumour development and metastasis in vivo;
Nature, 300, 31
194. West, W., Cannon, G.B., Kay, H.D., Bonnard, G.D.,
Herberman, R.B. (1977): Natural cytotoxic reactivity
of human lymphocytes against a myeloid cell line:
characterization of effector cells;
J. Immunol., 118, 355
195. Wintrobe, M.M. (Ed.) (1981): Clinical Haematology;
Lea & Febri, Philadelphia
196. Wright, S.C., Bonavida, B. (1981): Selective lysis of NK-
sensitive target cells by a soluble mediator released
from murine spleen cells and human peripheral blood
lymphocytes;
J. Immunol., 126, 1516
197. Wright, S.C., Bonavida, B. (1982): Studies on the
mechanism of natural killer (NK) cell-mediated cyto-
toxicity (CMC). I. Release of cytotoxic factor specific
for NK-sensitive target cells (NKCF) during co-culture
of NK effector cells with NK target cells;
J. Immunol., 129, 433

198. Wright, S.C., Bonavida, B. (1983): YAC-1 variant clones selected for resistance to natural killer cytotoxic factors are also resistant to natural killer cell-mediated cytotoxicity;
Proc. Natl. Acad. Sci., 80, 1688
199. Yogeewaran, G., Gronberg, A., Hansson, M., Dalianis, T., Kiessling, R., Welsh, R.M. (1981): Correlation of glycosphingolipids and sialic acid in YAC-1 lymphoma variants with their sensitivity to natural killer-cell-mediated lysis;
Int. J. Cancer, 28, 517
200. Zarling, J.M., Clouse, K.A., Biddison, W.E., Kung, P.C. (1981): Phenotypes of natural killer cell populations detected with monoclonal antibodies;
J. Immunol., 127, 2575
201. Zarling, J.M., Eskra, L., Borden, E.C., Horoszewicz, J., Carter, W.A. (1979): Activation of human natural killer cells cytotoxic for human leukemia cells by purified interferon;
J. Immunol., 123, 63
202. Zarling, J.M., Kung, P. (1980): Monoclonal antibodies which distinguish between human NK cells and cytotoxic T lymphocytes;
Nature, 288, 394
203. Ziegler, A., Laudien, D., Heinrichs, H., Müller, C., Uchanska-Ziegler, B., Wernet, P. (1981): K 562 cells express human major histocompatibility antigens;
Immunogenetics, 13, 359
204. Ziegler, A., Uchanska-Ziegler, B., Wernet, P., Zeuthen, J. (1983): Hybrids between human cell lines belonging to different hematopoietic pathways: analysis of HLA and myeloid surface antigens;
in 120, S. 462
205. Ziegler, H.-W., Kay, N.E., Zarling, J.M. (1981): Deficiency of natural killer cell activity in patients with chronic lymphocytic leukemia;
Int. J. Cancer, 27, 321

206. Ziegler-Heitbrock, H.-W.L., Erhardt, J., Riethmüller, G.
(1983): Treatment of fresh human leukemia cells with
actinomycin D enhances their lysability by natural
killer cells;
British Journal of Cancer, 48, 507
207. Ziegler-Heitbrock, H.-W.L., Riethmüller, G. (1984):
A rapid assay for cytotoxicity of unstimulated human
monocytes;
J. Natl. Cancer Inst. 72, 23

Lebenslauf

Am 30. Januar 1959 wurde ich als viertes von sieben Kindern der Geschäftsinhaber Hans und Agnes Erhardt in Bamberg geboren und lebte seither in Kulmbach.

Von 1965 bis 1968 besuchte ich die katholische Be-
kenntnisschule in Kulmbach und von 1968 bis 1969 die
Pestalozzi-Schule. 1969 trat ich in das Markgraf-
Georg-Friedrich-Gymnasium in Kulmbach ein, wo ich
1978 mit den Leistungskursen Biologie und Physik das
Abitur ablegte.

Seit 1978 studiere ich Humanmedizin an der medizini-
schen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München. Ich bestand die ärztliche Vorprüfung 1980,
den ersten Teil der ärztlichen Prüfung 1982 und den
zweiten Teil 1983. Von Oktober 1983 bis Juli 1984
war ich Gaststudent der Faculty of Medicine der Uni-
versity of Leeds. Nach dem praktischen Jahr an der
Chirurgischen Klinik des Städtischen Krankenhauses
München-Schwabing, an der Medizinischen Poliklinik
der LMU und am Dr. von Haunerschen Kinderspital der
LMU legte ich 1985 den dritten Teil der ärztlichen
Prüfung ab.

Die Arbeit an der vorliegenden Untersuchung begann
ich 1981 am Institut für Immunologie der Universität.

